annales de technologie agricole

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE
3 DEC. 1974
DOCUMENTATION
VERSAILLES

Trimestriel

1974

Vol. 23 . N° 1

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Ann. Technol. agric. ATAPAA 23 (1) 1-117 (1974)
FR ISSN 0003-4223

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle, 75007 PARIS Tél. : 551-41-09.

Directeur général : J.-M. SOUPAULT

Directeur général adjoint : J. POLY

Inspecteurs généraux : E. BILIOTTI, P. BOUVAREL, A. CAUDERON, G. FAUCONNEAU, R. FÉVRIER, P. MORNET, R. PÉRO, J. REBISCHUNG

Rédaction des Annales

Pour l'ensemble des Séries : J. POLY

Annales agronomiques.

— J. CHAUSSIDON, Chef du Département de Science du Sol, C. N. R. A.
— L. GACHON, Chef du Département d'Agronomie, 63100 Clermont-Ferrand.
— M. HALLAIRE, Chef du Département de Bioclimatologie, C. N. R. A.

Annales de l'Amélioration des Plantes.

— M. RIVES, Chef du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, 33140 Pont de la Maye.

Annales de Phytopathologie.

— J. PONCHET, Chef du Département de Pathologie végétale, 06602 Antibes.

Annales de Zoologie - Écologie animale.

— E. BIBLIOTTI, Inspecteur général de la Recherche agronomique.

Annales de Zootechnie.

— A.-M. LEROY, Professeur honoraire à l'Institut national agronomique.
— A. RÉRAT, Chef du Département de Nutrition, C. N. R. Z.

Annales de Technologie agricole.

— P. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, 21034 Dijon Cedex.
— A. GUILBOT, Directeur de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés C. E. R. D. I. A., Le Noyer-Lambert, 91300 Massy.
— G. MOCQUOT, Chef du Département de Technologie des Produits animaux, C. N. R. Z.

Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique.

— G. FAUCONNEAU, Inspecteur général de la Recherche agronomique.
— A. FRANÇOIS, Directeur de Recherche à l'I. N. R. A., Directeur du Centre national de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation.
— C. THIBAULT, Chef du Département de Physiologie animale, C. N. R. Z.

Annales des Sciences forestières.

— P. BOUVAREL, Inspecteur général de la Recherche agronomique, Chef du Département de Recherches forestières, C. N. R. F.
— J.-P. CHESNEAU, École nationale du Génie rural, des Eaux et des Forêts, 54000 Nancy.
— J. PARDÉ, Directeur de la Station de Sylviculture et de Production, C. N. R. F.

Annales de Génétique et de Sélection animale.

— P. MÉRAT, Directeur de la Station de Génétique factorielle, C. N. R. Z.
— B. VISSAC, Chef du Département de Génétique animale, C. N. R. Z.

Apidologie (Revue franco-allemande, co-édition I. N. R. A.-Deutscher-Imkerbund).

— J. LOUVEAUX, Directeur de la Station de Recherches sur l'Abeille et les Insectes sociaux, 91440 Bures sur Yvette.

Annales de Recherches vétérinaires.

— P. MORNET, Inspecteur général de la Recherche agronomique.

Annales d'Hydrobiologie.

— R. FÉVRIER, Inspecteur général de la Recherche agronomique.
— C. THIBAULT, Chef du Département de Physiologie animale, C. N. R. Z.
— R. VIBERT, Chef du Département d'Hydrobiologie, 64200 Biarritz.

Annales d'Économie et de Sociologie rurales.

— M. MAZOYER, Département d'Économie et de Sociologie rurales.

ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

Service des Publications de l'I. N. R. A., route de Saint-Cyr, 78000 VERSAILLES, Tél. : 950-75-22

TABLE DES MATIÈRES

J.-C. Autran. — Les désoxyribonucléoprotéines et les histones du grain de blé. Aspects physico-chimique et physiologique 1

Andrée Ournac, C. Poux. — La peroxydase du raisin. Étude de quelques propriétés..... 17

R. Monet, Y. Bastard, Bernadette Campoy. — Étude de la variation de la dureté du fruit *in situ* chez le Pêcher..... 39

Nicole Crozet, Alice de Pastors, L. Petit. — Structure submicroscopique des fractions protéiques du gluten de blé soumises à l'action de différentes enzymes protéolytiques 51

A. Latrasse, B. Lantin. — Différences variétales parmi les hydrocarbures monoterpéniques de l'huile essentielle des bourgeons de Cassis..... 65

G. Montedoro, P. Fantozzi, M. Bertuccioli. — Essais de vinification de raisins blancs avec macération à basse température et macération carbonique..... 75

Mise au point.

J.-P. Touzel. — La demande biochimique en oxygène. Détermination et valeur de la mesure 97

Chronique des livres..... 113

Informations 115

CONTENTS

J.-C. Autran. — The desoxyribonucleoproteins and histones of wheat seed. Physico-chemical and physiological aspects..... 1

Andrée Ournac, C. Poux. — Peroxydase of the grape. Research on some properties.... 17

R. Monet, Y. Bastard, Bernadette Campoy. — Study on the firmness variation of the peach fruit *in situ*..... 39

Nicole Crozet, Alice de Pastors, L. Petit. — Submicroscopic structure of protein fractions from corn gluten during hydrolysis by various proteolytic enzymes..... 51

A. Latrasse, B. Lantin. — Varietal differences between the monoterpene hydrocarbons of the essential oil of black currant buds..... 65

G. Montedoro, P. Fantozzi, M. Bertuccioli. — Wine-making from white grapes by maceration at low temperature and by carbonic maceration..... 75

Bibliographical review.

J.-P. Touzel. — Biochemical oxygen demand : determination and value..... 97

Book review..... 113

Informations 115

Les Annales de Technologie agricole figurent dans Current Contents

I. N. 4. 036. 043. 5

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

PÉRIODIQUES

TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1974	France	Étranger	Le N°
ANNALES AGRONOMIQUES, 6 nos par an	175 F	190 F	35 F
ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES, 4 nos par an	135 F	150 F	45 F
ANNALES DE PHYTOPATHOLOGIE, 4 nos par an	155 F	170 F	55 F
ANNALES DE ZOOLOGIE-ÉCOLOGIE ANIMALE, 4 nos par an	155 F	170 F	55 F
ANNALES DE ZOOTECHNIE, 4 nos par an	155 F	170 F	55 F
ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE, 4 nos par an	135 F	150 F	45 F
ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE 4 nos par an	175 F	190 F	60 F
ANNALES DES SCIENCES FORESTIÈRES, 4 nos par an	135 F	150 F	45 F
ANNALES DE GÉNÉTIQUE ET DE SÉLECTION ANIMALE, 4 nos par an	155 F	170 F	55 F
ANNALES DE RECHERCHES VÉTÉRINAIRES, 4 nos par an	155 F	170 F	55 F
ANNALES D'HYDROBIOLOGIE, 2 nos par an	80 F	90 F	55 F

APIDOLOGIE, 4 nos par an — Abonnement : France : 38 F
Étranger sauf R. F. A. : 48 F
— Le numéro : France : 12 F
Étranger sauf R. F. A. : 13,50 F

DERNIERS OUVRAGES PARUS

Le Pois. Étude génétique des caractères, classification, caractéristiques variétales portant sur les variétés inscrites au catalogue officiel français, par **R. Cousin.**
111 p. et 140 fiches, 1974 ..... **150,00 F**

Contribution à l'étude de la Faune de France. Systématique de la tribu des Scymnini (Coccinellidae), par **J. M. Gourreau.**
223 p., 1974 ..... **85,00 F**

Les arbres et arbrisseaux acclimatés en région méditerranéenne française. Catalogue commenté, par **P. Augé, P. Allemand, R. Hamès.**
144 p., 1973 ..... **58,85 F**

Colloque sur l'ovogenèse et la folliculogenèse, Nouzilly, 14-16 déc. 1972.
258 p., 1973 ..... **120,00 F**

Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales, Versailles, 11-15 septembre 1972. Coédition I. N. R. A.-C. N. R. S.
549 p., 1973 ..... **160,50 F**

Recherches acridiennes à Madagascar.
262 p., 1972 ..... **80,00 F**

IVe Conférence du groupe international d'étude des virus et des maladies à virus de la vigne, Colmar 16-18 juin 1970.
211 p., 1972 ..... **60,00 F**

Lombriciens de France, Écologie et Systématique par **M.-B. Bouché.**
671 p., 1972 ..... **150,00 F**

IIIe Conférence du Groupe consultatif des Statisticiens forestiers, Jouy en Josas, 7-11 septembre 1970.
332 p., 1972 ..... **139,75 F**

Symposium international sur le soufre en Agriculture. Versailles, 3-4 décembre 1970.
412 p., 1972 ..... **50,00 F**

Organismes du Sol et production primaire — IVe Colloquium pedobiologiae, Dijon 14-19 septembre 1970.
588 p., 1972 ..... **65,00 F**

La lutte biologique en forêt, Pont-à-Mousson, 12-14 novembre 1969.
212 p., 1971 ..... **45,00 F**

VIIIe Symposium européen sur les maladies à virus des arbres fruitiers. Bordeaux, 24-30 juin 1970.
560 p., 1971 ..... **65,00 F**

Essai de programmation de la Recherche (Département agronomie) par **D. Macquart, R. Gras, J. Mamy, L. Turc, J.-P. Deffontaines.**
70 p., 1971 ..... **30,00 F**

Les demandes d'abonnements et les commandes doivent être adressées au Service des Publications de l'Institut national de la Recherche agronomique, route de Saint-Cyr, 78000 Versailles.
Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des Publications de l'I. N. R. A., par virement postal à son compte courant : 9064-43 Paris, sans mentionner d'adresse, ou par bons U. N. E. S. C. O.
Les demandes peuvent être souscrites également par l'intermédiaire des libraires dans les conditions habituelles.
A Paris, bureau de vente : 11, rue Jean-Nicot.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2).

CONTENTS

Enzymes and cereal baking industries
Paris, 6-7 November, 1972
First Part

E. Salmon-Legagneur. — Foreword 123

Amylases

R. Delecourt. — Isolation, purification and properties of bacterial and fungal amylases 127

A. Belloc, J.-C. Palla, J. Verrier. — Isolation, purification and properties of two amylases of fungal origin 141

J.-C. Palla, J. Verrier. — Wheat alpha-amylase inhibition by ascorbic acid and isoalloxazine derivatives 151

M. Berger, P. Grandvoinnet. — Comparison in breadmaking of bacterial alpha-amylase, fungal alpha-amylase activity and of the activity af alpha-amylase extracted from barley cristallized malt (cristomalt) 161

G. Bussière, J.-F. de la Guérivière. — The use of alpha-amylase and glucamylase in bakery 175

Proteases

R. Delecourt. — Isolation, purification and properties of bacterial and fungal proteases.. 193

A. Belloc, J.-C. Palla, J. Verrier. — Isolation, purification and properties of two proteases from *Streptomyces* 205

M. Berger, P. Grandvoinnet. — A method for the differential determination of bacterial and fungal alpha-amylases in solution 215

L. Petit. — Critical study of the chemical methods of titration of proteolytic activities.. 223

M. Berger, P. Grandvoinnet, J.-F. de la Guérivière, G. Bussière. — Practical rheology tests for the valuation of proteolytic activities 233

A. Colas. — Practical rheology tests for the valuation of proteolytic activities 241

P. Ducroo. — Study of proteases action on wheat flour by means of the Brabender farinograph 249

J.-F. de la Guérivière, G. Bussière. — The use of proteases in the cereal baking industries 257

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3).

CONTENTS

Enzymes and cereal baking industries
Paris, 6-7 November 1972
Second Part

Lipases and lipoxygenases

J.-M. Caillat, R. Drapron. — Wheat lipase. Characteristics of its action in aqueous and dry media 273

J. Nicolas, Y. Beaux, R. Drapron. — Lipoxygenase activity assays. Development of a new colorimetric method 287

Y. Beaux, R. Drapron. — The isolation and some physico-chemical characteristics of lipoxygenase of the horse bean (*Vicia faba* L.) 309

A. Colas, A. Chargelegue. — Lipasic and lipoxygenasic activity of wheats and products of milling 323

J.-J. Étienne, M. Dubois. — Effects of lipoxygenase action of the broad bean on the characteristics of doughs and bread 335

R. Drapron, Y. Beaux, M. Cormier, J. Geffroy, A. Adrian. — Lipoxygenase action during bread making. Destruction of essential free fatty acids, carotenoids and tocopherols. Deterioration of the flavour of the bread 353

J.-C. Palla, J. Verrier. — Inhibition of bean lipoxygenase by hydroquinone derivatives 367

A. Chargelegue. — Lipoxygenase and french bread. Influence of *in situ* and purified lipoxygenase in panification 375

R. Guinet. — Lipoxygenase and french bread. The nature and the evolution of the flavour of french bread 385

S. Rochize. — Use of enzyme in E. E. C. countries 391

A. Guilbot. — Conclusions 399

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4).

CONTENTS

A. Casanova. — Ionometry. The determination of the calcium content in wines..... 403

P. Brechot, J. Chauvet, Madeleine Croson. — Effect of initial malic acid concentration of musts on starting off and evolution of malolactic fermentation..... 411

M.-C. Camus, J.-C. Laporte. — Study of the content and distribution of the trypsin-inhibitors of different wheats (*T. durum* and *T. vulgare*) with a method on gelatine film.. 421

J. Philippon, M.-A. Rouet-Mayer. — Physiological stage of development of french beans at harvest time and quality of the deep-frozen produce. I. — Objective quality tests of french beans intended for freezing..... 433

M.-A. Rouet-Mayer, J. Philippon. — Physiological stage of development of french beans at harvest time and quality of the deep-frozen and produce. II. — Evolution of the amounts of dry matter, ascorbic acid and chlorophylls *a* and *b* in the pericarp and seeds of french beans during growth..... 451

Barbara Neumannova, A. Paulin. — Temperature and relative humidity needed in stores used for opening of carnations..... 467

C. Flanzy, P. Andre, P. Benard, M. Buret, Y. Chambroy, C. Jouret. — Intracellular fermentation of grapes during anaerobic metabolism..... 481

Bibliographical review.

J. Gueguen, J. Lefebvre, L. Petit. — Glutenins..... 501

annales de technologie agricole

Trimestriel

1974

Vol. 23 . N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 1-16.

LES DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES ET LES HISTONES DU GRAIN DE BLÉ. ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUE ET PHYSIOLOGIQUE (1)

J.-C. AUTRAN
avec la collaboration technique de Ginette GOBIN

Laboratoire de Recherches sur la Qualité des Blés, I. N. R. A., E. N. S. M. I. C., 16, rue Nicolas Fortin, 75013 Paris

RÉSUMÉ

Des désoxyribonucléoprotéines et des histones purifiées ont été isolées de différentes régions du grain de blé et particulièrement du germe. Pour ce qui est de la composition chimique et des propriétés physiques, on observe une grande similitude entre ces protéines et leurs homologues animales. En revanche, l'étude de l'hétérogénéité électrophorétique met en évidence une certaine originalité des histones du blé. Ces protéines restent cependant peu évolutives et leur intérêt au plan de la génétique des blés demeure limité. Les histones constituent, par contre, une voie d'approche particulièrement féconde en physiologie végétale, en raison de leur rôle fondamental au niveau de la répression de l'activité des gènes.

Mots clés : *blé, histone, nucléoprotéines, physiologie.*

I. — INTRODUCTION

Depuis toujours, les hommes ont été frappés par la remarquable possibilité des êtres vivants de se reproduire identiques à eux-mêmes. Une telle invariance reproductive ne peut matériellement s'expliquer que par l'existence d'une unité biologique renfermant la totalité des informations nécessaires et assurant le contrôle et la régulation du phénomène. On sait aujourd'hui que cette unité biologique est constituée par les acides nucléiques et particulièrement par l'ADN.

Comment expliquer alors que, dans un organisme supérieur, une cellule différenciée, qu'elle soit nerveuse, sanguine ou glandulaire, puisse posséder la totalité de l'information de l'individu tout en n'en utilisant que la très faible partie nécessaire

(1) Ce travail a fait l'objet d'une thèse de Doctorat d'État ès-Sciences naturelles préparée sous la direction de M. A. BOURDET, Directeur de Recherches à l'I. N. R. A., et soutenue le 20 juin 1973 à l'Université de Paris VI, sous la présidence de M. R. ULRICH, Professeur.

à sa fonction ? Comment expliquer que tel gène, bien que présent dans tout l'organisme, n'exerce son activité que dans telle cellule et non dans telle autre, et encore à certaines occasions seulement ?

Force est donc d'admettre qu'il existe un facteur régulateur qui sélectionne les informations devant être exprimées et qui empêche la transcription des autres. Comme l'a souligné VENDRELY (1967), les meilleurs candidats pour ce rôle de régulateur génique sont actuellement les histones, c'est-à-dire les protéines basiques apparemment associées à l'ADN, sous forme de complexe désoxyribonucléoprotéique, dans les noyaux cellulaires des organismes eucaryotes.

Cependant, malgré les innombrables travaux effectués et les nombreuses hypothèses formulées au sujet de la responsabilité des histones dans la répression de l'activité des gènes, ainsi d'ailleurs que dans le maintien de l'intégrité structurale de la chromatine, il faut reconnaître que la fonction précise des différents composants histones reste encore très mal connue.

Par ailleurs, la majeure partie des travaux antérieurs relatifs aux désoxyribonucléoprotéines et aux histones n'a guère concerné jusqu'ici que le secteur animal et principalement un organe très riche en composés nucléiques, le thymus de veau. Chez les végétaux, la connaissance des histones, qui ne s'est véritablement développée que depuis 1968, demeure très en retard sur celle de leurs homologues animales et a été essentiellement orientée vers les tissus à métabolisme intense, peut-être au détriment des organes de réserve.

Il n'était donc pas sans intérêt d'entreprendre une étude physico-chimique des désoxyribonucléoprotéines et des histones d'un organe végétal important tel que le grain de blé. En effet, le blé lui-même n'avait été, de ce point de vue, l'objet d'aucune étude approfondie et, à notre connaissance, aucun travail d'origine française intéressant directement les histones végétales n'avait encore été rapporté.

C'est donc en nous appuyant le plus souvent sur des travaux similaires du domaine animal que nous sommes parvenus à isoler du grain de blé, et particulièrement du germe, les désoxyribonucléoprotéines et les histones. Nous avons déterminé quelques-unes de leurs caractéristiques physico-chimiques afin de dégager des conclusions quant à leur originalité vis-à-vis des protéines animales homologues. Nous avons ensuite appliqué ces données à des études de nature essentiellement physiologique afin de :

— donner un aperçu de l'évolution des histones au cours des transformations physiologiques du grain,

— mettre en évidence leur éventuelle variabilité au niveau de quelques espèces et variétés,

— émettre enfin certaines hypothèses quant au rôle biologique possible de leurs différents composants.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. — *Échantillons étudiés*

En raison des importantes quantités de matériel requises pour les études physico-chimiques, les protéines dont il est fait état ont été le plus souvent isolées du germe de blé industriel. Cette région du grain constitue en effet un matériel idéal en raison de sa faible teneur en substances de réserve insolubles et de sa richesse relative en constituants nucléiques ; contrairement au grain

de blé total qui ne contient que 0,10 p. 100 d'ADN et à l'albumen qui n'en contient que 0,05 p. 100, le germe renferme plus de 1 p. 100 d'ADN.

En revanche, les études physiologiques ont été conduites à partir d'un matériel mieux défini et plus diversifié : grains en cours de maturation et de germination, différents tissus du grain, germes de différents types de blés et de céréales.

2. — *Isolement des désoxyribonucléoprotéines* (DNP) *et des histones*

Il a pu être réalisé selon deux principes différents.

L'un fait intervenir un isolement préalable des noyaux cellulaires par pulvérisation du tissu en milieu glycérol, filtration et centrifugation différentielle (sédimentation à 300 *g*). A partir d'une telle préparation de noyaux, il est alors aisé de séparer les différents constituants nucléaires, comme le montre la figure 1. Si l'on évite toute dégradation enzymatique, ce procédé apparaît très sûr quant à l'isolement de protéines représentatives du matériel nucléaire. Mais son inconvénient est de ne fournir que de très faibles quantités de DNP en raison du faible rendement de l'isolement des noyaux cellulaires, phénomène assez général dans les tissus végétaux, dû aux membranes cellulosiques.

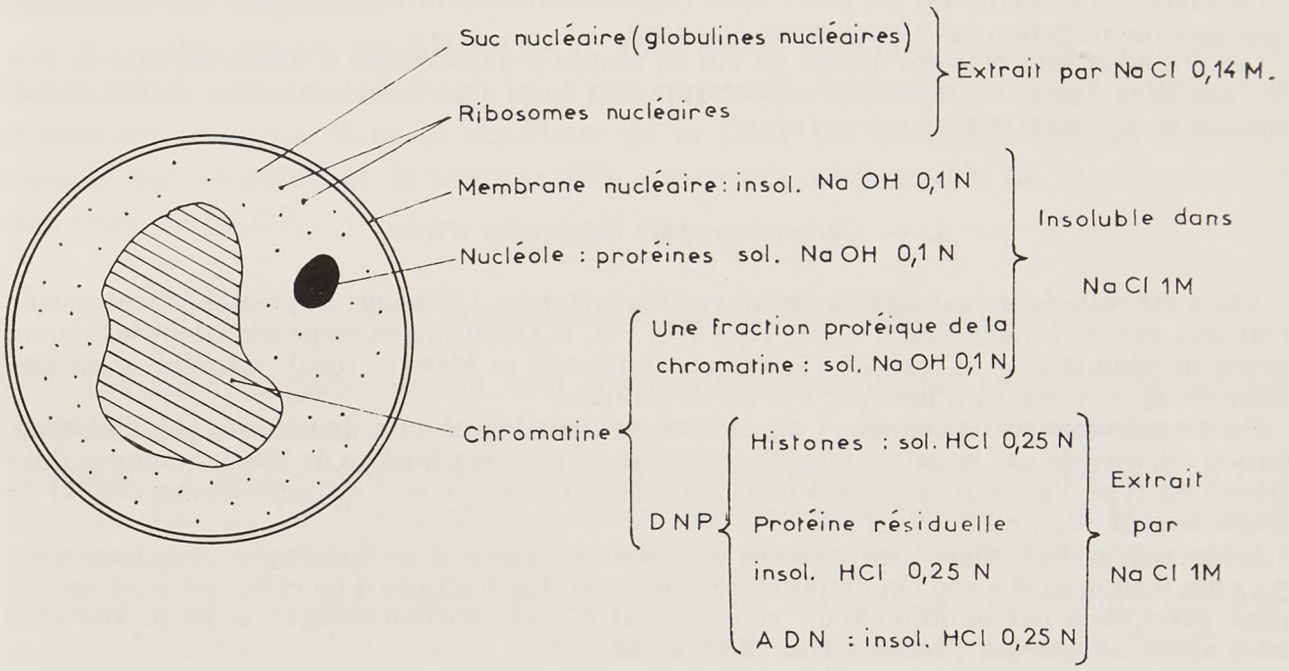


Fig. 1. — *Schéma d'un noyau cellulaire. Caractéristiques de solubilité de ses constituants.*

L'autre procédé est fondé sur les seules propriétés de solubilité des DNP et utilise le principe de Mirsky et Pollister (1942), c'est-à-dire l'extraction différentielle des ribonucléoprotéines et autres protéines cytoplasmiques en milieu NaCl 0,14 M, puis des DNP en milieu salin concentré. L'intérêt de cette méthode est de conduire à des préparations de DNP très purifiées avec un rendement élevé (de l'ordre de 90 p. 100). Cent grammes de germes permettent donc d'obtenir environ 2,2 grammes de DNP purifiée. En revanche, on ne peut être assuré *a priori* de l'intégrité des DNP isolées, car le séjour en milieu salin concentré est susceptible de provoquer des dissociations entre l'ADN et les histones et, par suite, des réassociations non natives. Notre choix s'est cependant porté en faveur de ce second procédé en raison des rendements élevés qu'il permet et de l'identité apparente entre les protéines obtenues et celles isolées des noyaux cellulaires.

La fraction protéique basique de la DNP, c'est-à-dire l'histone, est alors simplement obtenue par traitement acide des préparations de DNP, la fraction acido-insoluble correspondant à l'ADN et aux protéines dites résiduelles.

3. — *Électrophorèse des histones*

La séparation électrophorétique est effectuée selon une technique inspirée de celle de Panyim et Chalkley (1969) dans un gel de polyacrylamide préparé par mélange des 3 solutions mères suivantes :

Solution A	Acrylamide Eastman Kodak	60 g
	NN'-méthylène-*bis*-acrylamide	2 g
	Eau distillée q.s.p.	100 ml
Solution B	NNN'N'-tétraméthyléthylènediamine (TEMED)	5,15 ml
	Acide acétique glacial	43,2 ml
	Eau distillée q.s.p.	100 ml
Solution C	Persulfate d'ammonium	0,2 g
	Urée (10 M), soit	60 g
	Eau distillée q.s.p.	100 ml

Le gel est obtenu en réunissant les 3 solutions A, B, C dans les proportions 20, 10, 50, puis en versant le mélange dans un moule démontable de 140 × 160 × 3 mm. Après polymérisation, il est immergé durant une nuit dans 1 litre d'acide acétique 0,9 N également utilisé comme milieu des bacs à électrodes. Sa composition est alors la suivante : Acrylamide 15 p. 100, NN'-méthylène-*bis*-acrylamide 0,5 p. 100, urée 6,25 M. Le pH est de 3,2.

Après 2 heures de précourant à 7 V/cm, la solution d'histone (concentration 0,75 p. 100 dans l'urée 10 M) est déposée au moyen d'un papier filtre de 10 × 3 mm inséré dans le gel.

La migration a lieu durant 4 h 30 à 7 V/cm (approximativement 12 mA/cm² de section de gel). La distance de migration est alors voisine de 10 cm.

Les protéines sont colorées durant 30 mn au moyen d'une solution d'Amidoschwarz 10 B à 0,1 p. 100 dans l'acide acétique 7 p. 100 et l'éthanol 20 p. 100. La décoloration s'effectue par immersion dans l'acide acétique 7 p. 100.

4. — *Chromatographie d'échanges d'ions*

Elle a été réalisée sur colonne de carboxyméthylcellulose. L'échangeur, préalablement purifié par lavages successifs dans NaOH 0,5 N, H_2O, HCl 1 N, H_2O, est mis en suspension dans le tampon formiate de sodium 0,03 M, pH 4,8 (Johnson, Driedger et Marko, 1964), introduit dans une colonne de 25 × 1 cm, puis lavé par 150 ml de tampon.

On dépose alors sur la colonne 3 ml de tampon dans lequel on a dissous 100 mg d'histone. L'élution est réalisée par 70 ml de tampon, puis par un gradient linéaire de NaCl au moyen d'un dispositif de type Varigrad contenant dans les compartiments 1 et 2 respectivement 100 ml de formiate 0,03 M et 95 ml de NaCl 2 M.

L'absorption de l'effluent est mesurée en continu à l'aide d'un Élugraphe, simultanément à 274,5 nm (histones) et à 260 nm (impuretés nucléiques). Les fractions d'un même pic sont ensuite réunies, précipitées par addition d'un volume égal d'acide trichloracétique à 30 p. 100 puis séchées après lavages par l'acétone-HCl et l'acétone.

5. — *Précipitation fractionnée par l'acétone*

On dissout 250 mg d'histone dans 20 ml d'eau. On y ajoute 3 volumes d'acétone et 0,1 ml d'HCl concentré. Le précipité formé est centrifugé 10 mn à 18 000 tr/mn. Au surnageant obtenu, on ajoute de l'acétone par fractions de 10 ml en séparant par centrifugation le précipité obtenu à chaque opération. En poursuivant jusqu'à 8-10 volumes d'acétone on obtient, à partir de l'histone totale, une succession de fractions de constitutions différentes.

6. — *Méthodes analytiques diverses*

L'azote total est dosé selon la méthode de Kjeldahl avec le catalyseur $CuSO_4$-K_2SO_4 (1/10).

Les acides aminés sont séparés et dosés à l'auto-analyseur Technicon, selon la méthode de Moore et Stein (1954).

Dans le cas d'un matériel purifié, les acides nucléiques sont déterminés par hydrolyse perchlorique, spectrophotométrie ultraviolette et colorimétrie du désoxyribose. Dans le grain de blé et ses différentes régions, on a effectué la moyenne des résultats fournis par quatre méthodes distinctes de détermination, comme nous l'avons rapporté antérieurement (Autran et Bourdet, 1971 *a*).

III. — CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES

1. — *Composition chimique des DNP*

Les DNP purifiées renferment 40 p. 100 d'ADN, 1,5 p. 100 d'ARN et 58 p. 100 de protéines dont les 3/4 sont acido-solubles (histones) et le 1/4 acido-insoluble (protéines résiduelles). La proportion d'ADN est du même ordre de grandeur que chez les DNP animales. La reproductibilité de cette valeur de 40 p. 100 entre différentes expériences et même divers procédés semble constituer un argument en faveur du fait que la « désoxyribonucléoprotéine » ainsi isolée n'est vraisemblablement pas un artefact de préparation tel qu'un mélange d'ADN et de protéines ayant, par hasard, précipité simultanément, mais bien une nucléohistone dont l'intégrité physico-chimique est respectée.

La faible teneur en ARN (1,5 p. 100) existe toujours dans les préparations de DNP. Nous ignorons s'il s'agit ici d'une impureté résiduelle ou si cet ARN est normalement impliqué dans la structure de la DNP tel que l'ARN de la chromatine signalé par Bonner et Huang (1966), qui serait responsable de la reconnaissance des sites de l'ADN.

2. — *Caractéristiques de solubilité des DNP*

Les DNP du germe de blé, tout comme leurs homologues animales, apparaissent solubles à la fois en milieu salin concentré et dans l'eau pure et présentent donc un minimum de solubilité pour les concentrations isotoniques de la cellule (NaCl 0,14 M). Les solutions de DNP présentent toujours une viscosité très élevée et leur précipitation se produit généralement sous forme d'épaisses fibres. En outre, ces solutions présentent une intense absorption ultraviolette. Le spectre, qui traduit simultanément la présence d'ADN et de protéines, apparaît en fait très proche de celui d'un ADN pur car le coefficient d'extinction des histones est environ 80 fois plus faible que celui de l'acide nucléique. Toutefois, le maximum d'absorption de la DNP reste inférieur d'environ 17 p. 100 à celui de l'ADN libre, du fait de l'existence probable de liaisons entre les histones et l'ADN, entraînant, pour les groupements chimiques impliqués dans l'absorption, un moindre degré de liberté.

Finalement, pour ce qui est des différentes propriétés physico-chimiques dont nous venons de faire état, on ne peut que conclure à une grande similarité entre les DNP de germe de blé et les complexes homologues étudiés jusqu'ici chez de nombreux tissus animaux et chez quelques végétaux.

3. — *Composition des histones*

L'analyse des histones, c'est-à-dire des fractions basiques isolées par traitement acide de la DNP, met en évidence un taux d'azote de 15,8 p. 100 et donc, en principe, une pureté protéique proche de 100 p. 100. Toutefois, comme cela fut déjà rapporté dans le cas du thymus de veau, les préparations contiennent des traces d'ARN et de phosphore, élément dont l'origine pourrait être recherchée notamment dans les formes phosphorylées de certains acides aminés tels que la sérine.

Si l'on étudie la composition en acides aminés, on note, comme chez les autres histones, une grande richesse en acides aminés basiques (25 p. 100 des acides aminés totaux) et une absence quasi totale de cystéine et de tryptophane. Ce dernier caractère explique l'allure particulière du spectre ultraviolet : contrairement à celui de protéines classiques, telles que la sérumalbumine dont le maximum se situe à 278 nm, celui de l'histone de germe est à 274,5 nm, car il est essentiellement le fait de la tyrosine.

Toutes ces propriétés caractérisent en fait la plupart des histones. Elles ne mettent pas vraiment en évidence d'originalité pour l'histone de germe de blé. D'où l'intérêt d'examiner à présent les résultats fournis par les techniques de fractionnement.

4. — *Constitution protéique des histones*

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide met en évidence (fig. 2), pour l'histone de germes, 7 composants principaux, contrairement à l'histone de thymus de veau prise habituellement comme référence, qui n'en possède que 4 ou 5. Ces derniers sont d'ailleurs aisément identifiables d'après les travaux de Fambrough et Bonner (1969) et de Panyim et Chalkley (1969). Selon la nomenclature de Johns *et al.* (1960), on retrouve les fractions : F_3 dimère, F_1, $F_3 + F_2b$, F_2a_2 et F_2a_1, respectivement par ordre de mobilité croissante. Selon la nomenclature de Luck *et al.* (1958), les composants correspondants sont : III dimère, I, III + II_{b1}, II_{b2}, IV.

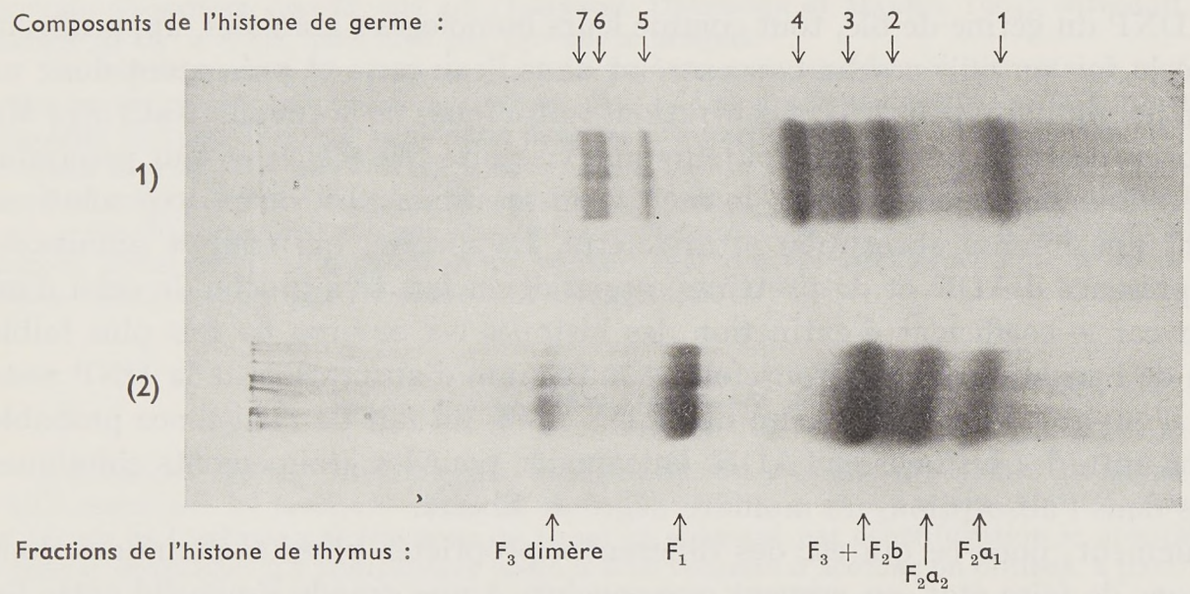


Fig. 2. — *Diagrammes électrophorétiques en gel de polyacrylamide d'une histone de germe de blé* (1) *et d'une histone de thymus de veau* (2)

La constitution de l'histone de germe étant très différente de cette dernière, il est impossible de reconnaître directement ses composants, sauf peut-être dans le cas de la bande frontale qui semble commune aux deux histones. D'où l'idée de tenter d'isoler séparément les différents constituants électrophorétiques afin de les analyser et de conclure quant à leur éventuelle homologie avec des types connus, comme l'ont fait récemment de Lange *et al.* (1969) sur l'histone de pois.

Cet isolement a été réalisé ici en conjuguant la chromatographie sur carboxyméthylcellulose et la précipitation fractionnée par l'acétone. Le précipité obtenu

entre 5 et 8 volumes d'acétone correspond ainsi au composant n° 1 ; le pic 3 de chromatographie de la fraction précipitée entre 3,5 et 4,5 volumes d'acétone s'identifie à la bande n° 2 ; le précipité recueilli entre 3 et 3,5 volumes d'acétone renferme les composants n° 3 et 4 ; enfin, le pic 1 de chromatographie regroupe les bandes n° 5, 6, 7.

La figure 3 montre le comportement électrophorétique de ces quatre principaux constituants comparativement à une histone totale et à une histone reconstituée.

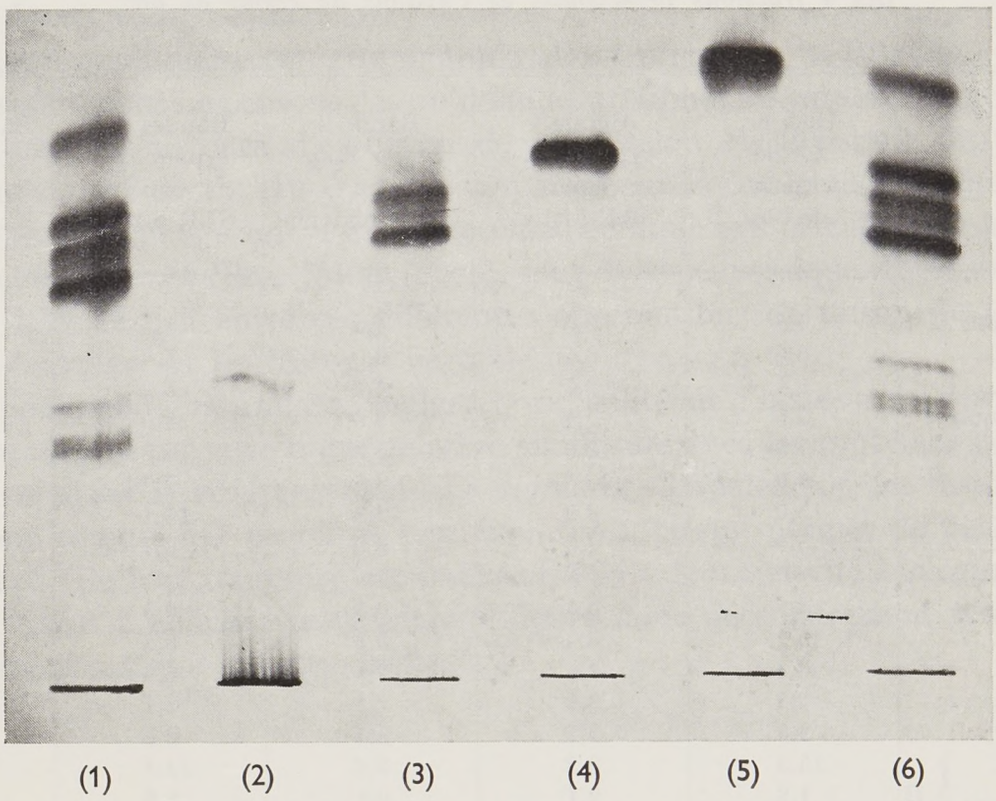


FIG. 3. — *Isolement des principaux composants de l'histone de germe de blé*
Diagrammes électrophorétiques d'une histone totale témoin (1), des composants de types F_1 (2), F_2b (3), F_2a_2 (4), F_2a_1 (5) et d'une histone reconstituée (6).

La composition en acides aminés de ces fractions (tabl. 1), ainsi que diverses observations relatives à l'affinité pour l'ADN, au caractère hydrophobe, au rapport *e/m* de la charge électrique à l'encombrement moléculaire, permettent alors d'identifier, ou plus exactement d'apparenter, ces fractions à des catégories classiques de composants histones.

Ainsi, le composant n° 1, qui apparaît le plus apolaire et le plus fortement lié à l'ADN, présente une mobilité et une composition en acides aminés presque identiques à celles du composant F_2a_1 ou histone IV. Il faut rappeler que DE LANGE *et al.* (1969) ont trouvé, pour cette histone, des structures primaires extrêmement voisines dans le thymus de veau et dans le pois. Il pourrait bien en être de même avec le germe de blé, ce qui irait dans le sens d'une certaine universalité de cette fraction, même au niveau d'organismes très éloignés.

Des considérations analogues permettent d'apparenter le composant n° 2 au groupe des histones F_2a_2, bien que l'analogie soit moins étroite qu'avec le type F_2a_1. Cependant, ce composant apparaît fréquemment associé à une bande de mobilité moyenne qui s'accroît par oxydation et qui s'efface après réduction de l'histone. Cela, associé à la présence de traces de cystéine dans le composant n° 2, suggère qu'une

fraction de type F_3, ne figurant chez le germe qu'à l'état de traces, puisse exister, soit sous une forme dimère (oxydée), soit sous une forme monomère (réduite) qui viendrait contaminer le composant n° 2, dans nos conditions d'électrophorèse.

TABLEAU I

Composition en acides aminés
(en moles d'acide aminé pour 100 moles des acides aminés présents)
des 4 fractions principales de l'histone de germe de blé

	Histone totale de germe de blé	Bande 1 type « F_2a_1 » ou GAR-histone	Bande 2 type « F_2a_2 » ou ALR-histone	Bandes 3, 4 type « F_2b » ou SLR-histone	Bandes 5, 6, 7 type « F_1 » ou VLAR-histone
Acide aspartique A	4,5	5,6	4,2	5,5	3,8
Thréonine	5,6	6,4	6,0	5,5	6,3
Sérine	4,4	2,7	4,2	*6,2*	5,4
Acide glutamique A	7,6	7,4	9,0	8,0	5,5
Proline	7,5	2,0	5,8	6,8	9,7
Glycocolle	8,0	*13,8*	8,6	7,7	6,8
Alanine	13,0	8,2	12,5	14,1	*19,8*
Valine	5,9	8,9	6,0	6,7	5,4
Cystéine	0	0	tr.	0	0
Méthionine	tr.	0,4	0,4	0,5	0
Isoleucine	5,1	6,4	5,5	5,4	3,4
Leucine	8,1	8,4	9,1	6,6	5,8
Tyrosine	2,1	3,9	2,1	2,1	1,4
Phénylalanine	2,4	2,7	3,4	2,5	2,2
Lysine }	15,3	8,2	*9,4*	*14,8*	*16,3*
Histidine } B	1,8	2,1	2,1	1,9	1,9
Arginine }	8,2	*12,8*	*11,6*	5,6	5,7
Lys./Arg.	1,86	0,64	0,81	2,64	2,86
Acides A	12,1	13,0	13,2	13,5	9,3
Basiques B	25,3	23,1	23,1	22,3	23,9
B/A	2,09	1,78	1,75	1,65	2,57
Polaires (1)	45,6	43,1	44,4	45,7	43,0
Apolaires (2)	29,0	28,8	30,2	28,5	26,5
Pol./Apol.	1,57	1,50	1,47	1,60	1,62

(1) Acides aminés polaires : Asp, Thr, Sér, Glu, Lys, Arg.
(2) Acides aminés apolaires : Pro, Val, Mét, Ile, Leu, Phé.

Le groupe n° 3, 4 apparaît riche en lysine et en sérine. Son dédoublement, son caractère polaire et sa composition en acides aminés permettent de le classer dans le type F_2b, encore appelé II_a chez les végétaux.

Enfin, les composants 5, 6, 7, qui constituent le groupe le moins chargé et le moins lié à l'ADN, peuvent être rapportés au type F_1, habituellement très riche en lysine et alanine.

Il apparaît donc, dans l'histone de germe, à la fois des analogies et des dissemblances de constitution avec les histones antérieurement étudiées. Parmi les dissem-

blances, on relève principalement les suivantes. La présence, à l'état de traces seulement, d'histone F_3, pourrait expliquer à la fois une plus grande solubilité et une plus faible affinité pour l'ADN de l'histone de germe. L'absence de type F_1, très individualisé, entraîne l'existence d'un large groupe $F_1 + F_2b$ aux propriétés assez homogènes.

Donc, bien que présentant une complexité électrophorétique du même ordre et parfois supérieure à celle de ses homologues végétales et animales, l'histone de germe de blé apparaît faiblement différenciée sur le plan des propriétés physico-chimiques de ses composants.

Comment expliquer cette originalité? Contrairement à BUTLER, JOHNS et PHILLIPS (1968), nous ne pensons pas qu'il faille l'attribuer au caractère embryonnaire du germe, car les histones d'embryon de pois, selon FAMBROUGH, FUJIMURA et BONNER (1968), et de riz (IWAI, 1964) apparaissent normalement différenciées. Il ne semble pas non plus s'agir d'un caractère spécifique des céréales, car les histones de seigle, selon JOHN et NEIL JONES (1970), sont de type classique. Il est donc encore difficile de faire le lien entre ces différentes observations en raison du trop faible nombre de travaux sur les histones végétales.

Dans l'ensemble, cependant, malgré l'originalité de l'histone de germe de blé, l'idée qui se dégage est celle d'une relative similitude avec les protéines homologues des autres organismes végétaux et même animaux. Globalement, les histones apparaissent donc comme des protéines peu évolutives, ce qui permet de penser que la majeure partie de leur structure est indispensable à leur activité biologique. Toute hypothèse visant à élucider cette activité devra donc nécessairement tenir compte de cette caractéristique exceptionnelle.

IV. — ASPECTS PHYSIOLOGIQUES DE LA CONSTITUTION DES HISTONES

Les différentes observations rassemblées précédemment, particulièrement au sujet de la constitution protéique des histones, ont été appliquées à l'étude de quelques problèmes intéressant la physiologie du grain de blé.

L'intérêt de cet aspect se justifie par le rôle actuellement attribué aux histones dans le contrôle de l'expression des gènes. Les modifications qualitatives ou quantitatives éventuellement apportées à la constitution de ces protéines au cours des transformations physiologiques du grain sont, en effet, susceptibles de fournir indirectement de précieuses informations sur la fonction des histones elles-mêmes ou de certains de leurs composants.

C'est pourquoi, après une étude préalable concernant différents tissus du grain, nous nous sommes intéressés aux phénomènes de maturation et de germination ainsi qu'aux différences d'ordre génétique.

1. — *Histones isolées de différents tissus du grain*

Le protocole d'isolement des DNP et des histones a été appliqué à différents produits de la mouture semi-industrielle du grain, qui correspondent grossièrement à des régions de ce grain : la farine, représentative de l'albumen, les fractions inter-

médiaires, dites remoulages, riches en fractions périphériques et en parois cellulosiques des cellules de l'albumen, les sons, correspondant aux enveloppes externes.

Si l'on examine les protéines acido-solubles isolées des DNP de ces différents tissus, on observe que leur constitution diffère de celle de l'histone de germe ; les différences qualitatives correspondent, d'une part, à la perte des fractions F_1 dans les tissus périphériques ainsi que dans le grain total, perte que l'on pourrait attribuer à une insolubilisation sous l'influence de composés de type polyphénol, au cours des purifications de la DNP. D'autre part, par rapport à ceux de l'histone de germe, les diagrammes renferment des fractions supplémentaires de faible mobilité, que nous avons assimilées, après isolement et analyse des acides aminés, à des globulines nucléaires constitutives du suc nucléaire. Dans le germe, ces protéines sont normalement éliminées en milieu 0,14 M, tandis que dans les autres tissus du grain, en raison de la dégénérescence des cellules qui accompagne la maturation, elles seraient incomplètement extraites et viendraient donc contaminer l'histone.

Si l'on considère alors les seuls composants de nature histone, on ne peut noter aucune différence qualitative,mais tout au plus une différence quantitative entre, par exemple, le germe et l'albumen ; les fractions de mobilité élevée sont relativement moins importantes dans l'albumen que dans le germe. Cette observation rejoint d'ailleurs celles de Fambrough, Fujimura et Bonner (1968) qui, dans le pois, notent également que la fraction F_1 est moins représentée dans les organes embryonnaires que dans les organes différenciés.

On a noté, par ailleurs, une relation entre les histones et les fractions protéiques classiques définies selon Osborne (1907). Ainsi (fig. 4), les globulines (salino-solubles) de l'albumen du grain renferment une importante fraction histone très proche de celle isolée des DNP. De même, après purification des gluténines de germe, apparaît une fraction histone identique à celle isolée des DNP du même tissu (Autran et Bourdet, 1970).

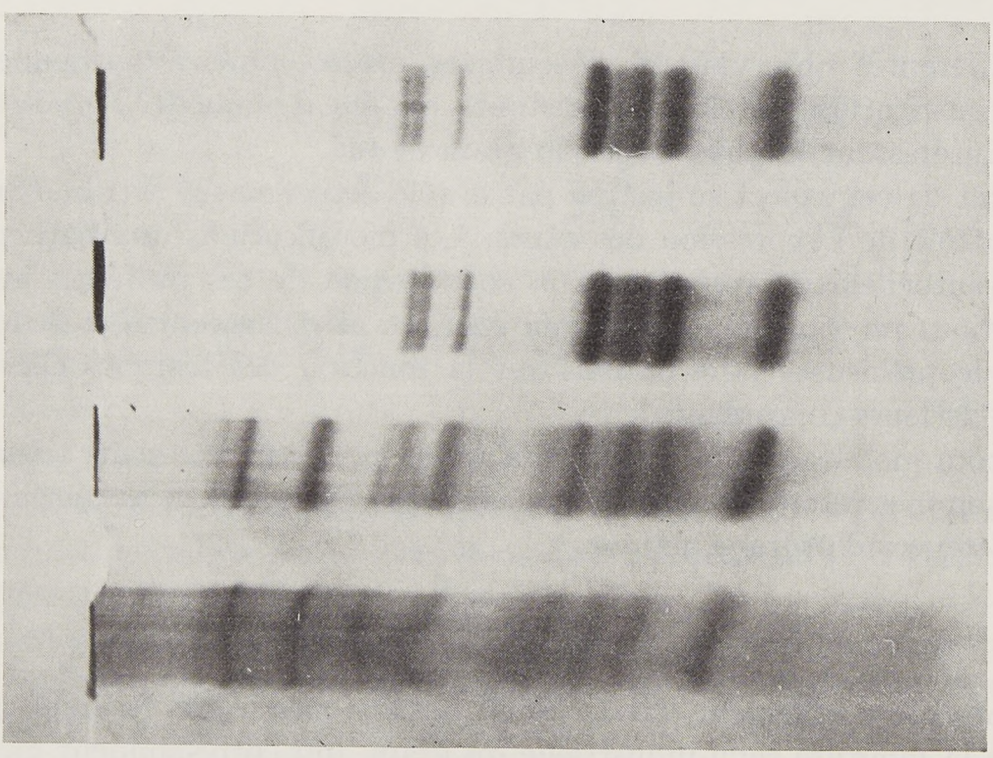


Fig. 4. — *Diagrammes électrophorétiques des protéines acido-solubles isolées de DNP de germe de blé* (1), *de gluténine purifiée de germe* (2), *de DNP de farine* (3) *et de globuline non purifiée de farine* (4).

En revanche, vraisemblablement en raison des différences d'accessibilité aux solvants de ces différents tissus, ni les globulines de germe, ni les gluténines d'albumen, ni d'ailleurs les fractions albumines et gliadines, ne contiennent d'histone.

2. — *Évolution des histones au cours de la maturation du grain*

L'analyse électrophorétique (fig. 5) des histones isolées de grains en cours de maturation fait apparaître une évolution significative.

Les premiers prélèvements (douzième et seizième jour après la fécondation) ne montrent que des fractions rapides F_2a et F_2b.

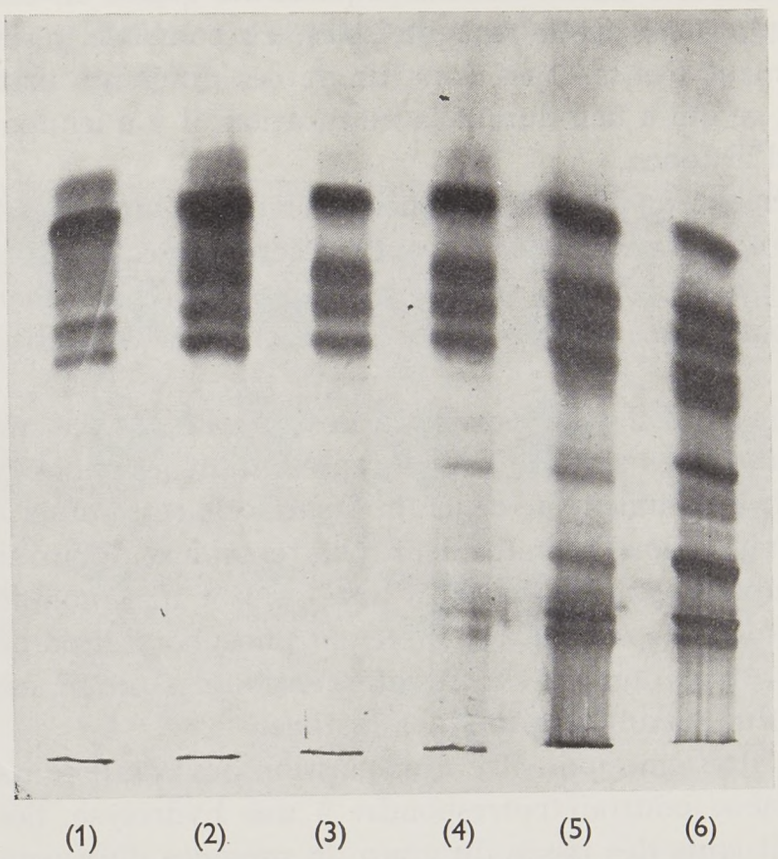


FIG. 5. — *Diagrammes électrophorétiques des histones isolées de grains de blés en cours de maturation*
Nombre de jours après la fécondation : (1) 12 j ; (2) 16 j ; (3) 23 j ; (4) 30 j ; (5) 41 j ; (6) 52 j

A partir du vingt-troisième jour, des composants de faible mobilité commencent à apparaître pour aboutir, au cinquante-deuxième jour (grain mûr) au diagramme classique de l'histone.

Si l'on néglige la contamination inévitable par les globulines nucléaires et dans la mesure où les protéines isolées représentent bien les entités biochimiques mobilisées au niveau de l'ADN, on constate que le jeune grain est pauvre en histones et que les nouvelles fractions (type F_1) n'apparaissent que vers les derniers stades de la maturation.

On peut donc imaginer que le ralentissement des synthèses lié à la maturation du grain s'accompagne d'un accroissement des protéines appelées à réprimer les nombreux gènes dont l'activité est devenue inutile et même nuisible pour la plante. En outre, ces protéines apparaissent essentiellement représentées par des histones F_1.

Ces observations s'accordent donc à celles de Fambrough, Fujimura et Bonner (1968) en ce sens que les fractions les plus riches en arginine (type F_2a), qui n'apparaissent pas influencées par la maturation, pourraient jouer un rôle dans la structure de la chromatine ainsi que dans la répression permanente de certaines séquences de l'ADN. Inversement, les histones F_1, plus riches en lysine, pourraient être responsables d'une répression temporaire. Leur rôle serait donc essentiellement fonctionnel ; elles sembleraient constituer des outils efficaces de régulation de l'activité des gènes.

3. — *Évolution des histones au cours de la germination*

Cette étude a été réalisée à la fois à partir de grains en cours de germination normale et d'embryons, préalablement isolés, en cours de germination sur milieu nutritif. L'isolement des histones à partir de ces différents matériels montre que, contrairement à ce qui a lieu durant la maturation, il y a ici abaissement progressif de la quantité d'histones.

Plus précisément, on observe l'évolution suivante. Durant les premières 24 heures, aucun changement n'apparaît, ce qui peut s'accorder avec le fait qu'au cours de cette période il n'y a pas de transcription de nouveaux ARN messagers, la synthèse protéique étant programmée par des ARN messagers déjà transcrits et conservés dans l'embryon sec.

Le deuxième jour, il y a disparition des histones F_1, ce qui pourrait signifier qu'il y ait libération des sites de l'ADN représentant les gènes devant être activés. En fait, il semble très difficile de conclure à partir de cette observation, car le mécanisme de la dérépression, certainement plus complexe, pourrait faire intervenir, non pas une simple libération des sites, mais plutôt une modification des histones n'impliquant pas leur départ, par exemple par phosphorylation de la sérine, acétylation de la lysine, thiolation, ou encore intervention des protéines non-histones de la chromatine en tant qu'antagonistes des histones.

A partir du troisième jour, il y a disparition des composants F_2a et F_2b. Selon nous, ce phénomène pourrait correspondre à une hydrolyse, liée à la dégradation des divers constituants des tissus du grain, la présence d'un composant très rapide venant à l'appui de cette hypothèse.

Finalement, après 3 jours de germination, les protéines isolées de la DNP ne correspondent plus qu'aux fractions contaminantes de l'histone (globulines nucléaires), tandis que la réapparition de fractions rapides au quatrième jour traduit certainement le développement en quantité significative des tissus de la plantule. Les histones de ces tissus, que nous avons étudiées séparément, sont d'ailleurs représentées essentiellement par des fractions F_2a et F_2b et dépourvues de fractions F_1, ce qui confirme l'absence, déjà signalée, de ces histones dans les tissus à métabolisme intense.

4. — *Influence des caractéristiques génétiques*

Cette étude, dont l'objet était de mettre en évidence une éventuelle spécificité génétique des histones, a été réalisée à partir d'une trentaine de variétés des espèces *aestivum, compactum* et *durum* du genre *Triticum,* puis étendue à quelques autres genres (*Hordeum, Secale, Aegilops*).

Comme nous l'avions précédemment rapporté (Autran et Bourdet, 1971 *b*), la comparaison des diagrammes électrophorétiques de ces histones montre qu'entre variétés d'une même espèce (fig. 6) aucune différence significative ne peut être relevée.

Si l'on compare différents genres, on n'observe que des dissemblances limitées et intéressant les seules fractions F_1. Les autres fractions (F_2a et F_2b) ne présentent aucune spécificité au niveau de ces genres de végétaux. Donc, contrairement à quelques travaux déjà anciens (Johns et Butler, 1962 ; Vendrely, Genty et Coirault, 1965), qui laissaient entrevoir une certaine spécificité pour les histones, nos résultats montrent au contraire l'influence très faible des caractéristiques génétiques sur la constitution des histones, ce que confirment plusieurs études très récentes (de Lange *et al.*, 1969, 1972 ; Smith, de Lange et Bonner, 1970 ; Panyim, Bilek et Chalkley, 1971 ; Sautière *et al.*, 1971).

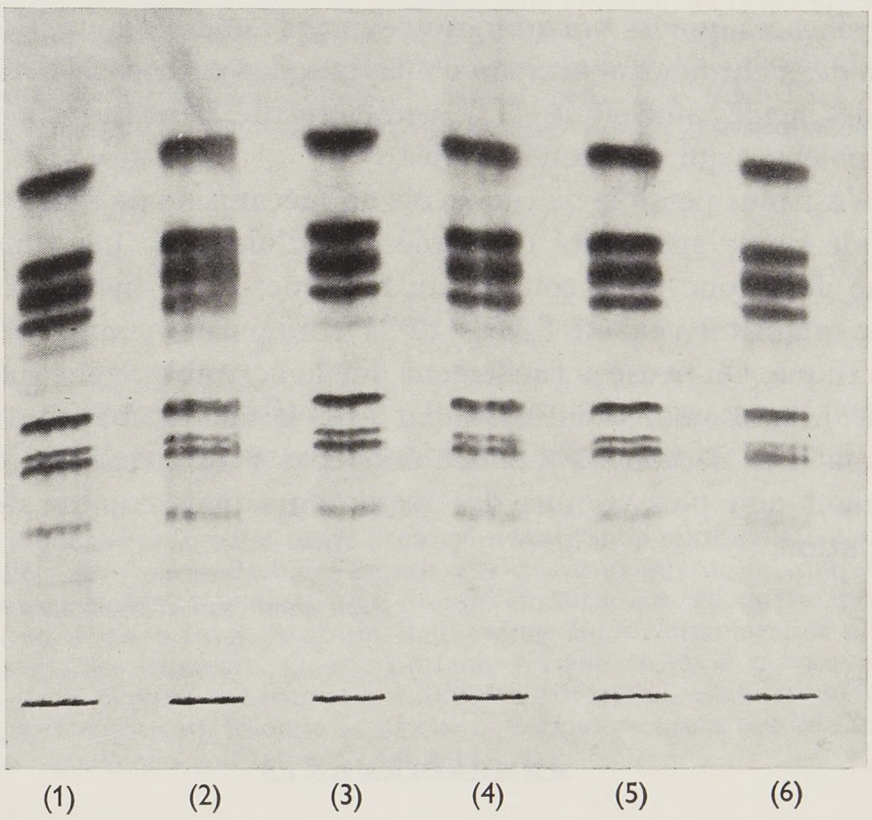


Fig. 6. — *Diagrammes électrophorétiques des histones isolées de germes de différentes variétés de* Triticum aestivum
(1) *Joss* ; (2) *Cappelle* ; (3) *Capitole* ; (4) *Progress* ; (5) *Atys* ; (6) *Magdalena*

Dans l'ensemble, les histones apparaissent donc peu spécifiques. Plus exactement, les fractions de type F_1 seraient relativement spécifiques, celles de types F_2b et F_2a_2 refléteraient seulement des différences au niveau des classes, des ordres ou des embranchements, celles de types F_3 et F_2a_1 pourraient être quasi universelles, même dans leur structure primaire. Ces dernières histones sont certainement sous la dépendance de gènes ne tolérant des modifications que dans des limites très étroites, tout autre mutation étant vraisemblablement létale.

Cette absence de modification évolutive, qui n'a pas d'équivalent dans la nature, ne peut qu'être liée à une importance fondamentale de ces protéines et au caractère

fonctionnel de la quasi totalité de leur molécule. Elles pourraient donc constituer des agents complexants hautement spécifiques de la structure en double hélice de l'ADN, seule donnée biochimique n'ayant pas varié durant l'évolution.

V. — CONCLUSION

L'étude de la constitution des histones ne paraît pas utilisable en chimiotaxonomie des blés courants et ne semble présenter un intérêt, en génétique, qu'au niveau du matériel obtenu par des hybridations éloignées.

En revanche, les histones semblent se prêter à d'intéressantes études physiologiques et nous pensons que ce travail constitue, au niveau des blés, une première base pour le développement des recherches dans ce secteur. Mais de nombreux travaux, à la fois biochimiques et physiologiques, mettant en œuvre des techniques plus complexes et efficaces que les nôtres (établissement de la séquence des acides aminés, reconstitution de la chromatine, emploi d'enzymes de synthèse de l'ADN et de l'ARN, hybridation des acides nucléiques, ...) seront encore nécessaires pour résoudre les nombreux problèmes qui demeurent posés.

Ainsi, il n'est plus possible de concevoir un mécanisme de répression de l'activité des gènes fondé sur la spécificité des molécules d'histones. La compréhension d'un tel mécanisme doit donc tenir compte du fait que, si les histones sont nécessaires pour masquer quantitativement l'ADN de la chromatine, leur effet n'est probablement pas spécifique. On pense actuellement que le véritable agent spécifique pourrait être un ARN chromosomal éventuellement associé aux protéines non-histones. Les histones elles-mêmes ne contribueraient donc pas à la spécificité de la répression et apparaîtraient non plus comme des régulateurs mais comme des outils passifs de cette régulation.

Reçu pour publication en novembre 1973.

REMERCIEMENTS

Nous remercions MM. Petit et Lefebvre, de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., Massy, pour les déterminations d'acides aminés ainsi que M. Colas, des Grands Moulins de Paris, pour la fourniture des germes de blé industriels.

SUMMARY

DESOXYRIBONUCLEOPROTEINS AND HISTONES IN WHEAT KERNELS. PHYSICO-CHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL ASPECTS

Purified desoxyribonucleoproteins and histones were isolated in different parts of wheat kernels and especially of the germ. As to the chemical composition and physical characteristics a great similarity was observed between proteins and the corresponding proteins in animals. On

the contrary the study of electrophorectic heterogeneity reveals an originality of wheat histones. Howerer these proteins show no important evolution, and are little interesting from the point of view of wheat genetic improvement. On the other hand histones allow a very promising approach in plant physiology with respect to their basic role in the repression of gen activity.

ZUSAMMENFASSUNG

DIE DESOXYRIBONUKLEOPROTEINE UND DIE HISTONE DER WEIZENKÖRNER. CHEMISCH-PHYSIKALISCHE UND PHYSIOLOGISCHE ASPEKTE

Die gereinigter Desoxyribonukleoproteine und Histone von verschiedenen Zonen des Weizenkorns und besonders vom Keim wurden isoliert. In bezug auf die chemische Zusammensetzung und die physikalischen Eigenschaften beobachtet man eine starke Ähnlichkeit zwischen diesen Proteinen und ihren animalischen Homologen. Die Untersuchung der elektrophoretischen Ungleichartigkeit zeigt jedoch eine gewisse Originalität der Weizenhistone. Diese Proteine entwickeln sich jedoch nur wenig und sie sind vom Standpunkt der Genetik des Weizens von beschränktem Interesse. Die Histone hingegen bieten besonders fruchtbare Untersuchungsmethoden auf dem Gebiet der Pflanzenphysiologie wegen ihrer entscheidenden Rolle bei der Unterdrückung der Gen-Aktivität.

RIASSUNTO

LE DESOSSIRIBONUCLEOPROTEINE E GLI ISTONI DEL GRANO DI FRUMENTO. ASPETTI FISICO-CHIMICO E FISIOLOGICO

Delle desossiribonucleoproteine e degli istoni purificati sono stati isolati da diverse regioni del grano di frumento e in particolare dal germe. Per quanto riguarda la compositione chimica e le proprietà fisiche, è stata osservata una grande similitudine tra queste proteine e quelle animali di stesso tipo. D'altra parte, lo studio dell' eterogeneità elettroforetica mostra una certa originalità degli istoni del frumento. Queste proteine restano tuttavia poco evolutive e il loro interesse sul piano della genetica del frumento è limitato. Gli istoni costituiscono invece un mezzo d'avvicinamento particolarmente fecondo in fisiologia vegetale a causa del loro ruolo fondamentale al livello della repressione dell' attività dei geni.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Autran J.-C., Bourdet A., 1970. Histones de germes et de farine de blé. *C. R. Acad. Sci.*, Sér. D, **271** (22), 2050-2053.

Autran J.-C., Bourdet A., 1971 *a*. La détermination des constituants nucléiques du blé et leur répartition dans le grain. *Ann. Technol. agric.*, **20** (2), 179-183.

Autran J.-C., Bourdet A., 1971 *b*. Constitution électrophorétique des histones de germes de différents types de blés. *C. R. Acad. Sci.*, Sér. D, **272** (21), 2732-2735.

Bonner J., Huang R. C., 1966. *The histones*. Ciba Foundation Study Group, n° 24, 18. Churchill J. and A., Ltd, London.

Butler J. A. V., Johns E. W., Phillips D. M. P., 1968. Recent investigations on histones and their functions. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **18**, 209-244.

De Lange R. J., Fambrough D. M., Smith E. L., Bonner J., 1969. Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone IV. Comparison with the homologous calf thymus histone. *J. Biol. Chem.*, **255** (20), 5669-5679.

De Lange R. J., Hooper S. A., Smith E. L., 1972. Complete amino acid sequence of calf thymus histone III. *Proc. Nat. Acad. Sci., U. S. A.*, **69** (4), 882-884.

Fambrough D. M., Fujimura F., Bonner J., 1968. Quantitative distribution of histone components in the pea plant. *Biochemistry*, **7** (2), 575-584.

Fambrough D. M., Bonner J., 1969. Limited molecular heterogeneity of plant histones. *Biochim. Biophys. Acta*, **175**, 113-122.

Iwai K., 1964. Histones of rice embryos and of *chlorella*. In Bonner J., Ts'o P., *The nucleohistones*, 59-65. Holden-day inc. San Francisco.

John P. C. L., Neil Jones R., 1970. Molecular heterogeneity of soluble proteins and histones in relationships to the presence of B-chromosomes in rye. *Exptl. Cell. Research*, **63**, 271-276.

Johns E. W., Phillips D. M. P., Simson P., Butler J. A. V., 1960. Improved fractionations of arginine-rich histones from calf thymus. *Biochem. J.*, **77**, 631-636.

Johnson L. D., Driedger A., Marko A. M., 1964. Chromatographic behaviour of histones on Sephadex and CMC. *Can. J. Biochem.*, **42**, 795-811.

Luck J. M., Rasmussen P. S., Satake K., Tsvetikov A. N., 1958. Further studies on the fractionation of calf thymus histone. *J. Biol. Chem.*, **233**, 1407-1414.

Mirsky A. E., Pollister A. W., 1942. Properties of isolated chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **28**, 344.

Moore S., Stein W. H., 1954. Procedures for the chromatographic determination of amino acids on four per cent cross-linked sulfonated polystyrene resins. *J. Biol. Chem.*, **211**, 893-906.

Osborne T. B., 1907. *The proteins of wheat kernel.* Carnegie Institution of Washington. Pub. nº 84.

Panyim S., Chalkley R. C., 1969. The heterogeneity of histones. I. A quantitative analysis of calf histones in very long polyacrylamide gels. *Arch. Biochem. Biophys.*, **130** (1-2), 337-346.

Panyim S., Bilek D., Chalkley R., 1971. An electrophoretic comparison of vertebrates histones. *J. Biol. Chem.*, **246** (13), 4206-4215.

Sautière P., Tyrou D., Moschetto Y., Biserte G., 1971. Structure primaire de l'histone riche en glycine et en arginine isolée de la tumeur de chloroleucémie du rat. *Biochimie*, **53** (4), 479-483.

Smith E. L., de Lange R. J., Bonner J., 1970. Chemistry and biology of histones. *Physiol. Reviews*, **50** (2), 159-170.

Vendrely R., Genty N., Coirault Y., 1965. Étude comparée des histones d'érythrocytes chez diverses espèces animales. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **47** (12), 2233-2240.

Vendrely R., 1967. Données récentes sur les histones. *Pathol. Biol.*, **15** (1-2), 71-77.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 17-37.

LA PEROXYDASE DU RAISIN. ÉTUDE DE QUELQUES PROPRIÉTÉS

Andrée OURNAC (†) et C. POUX
avec la collaboration technique de J.-L. BATLLE

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A., 11104 Narbonne

RÉSUMÉ

Une technique d'extraction et d'évaluation, mise au point par les auteurs, a été utilisée pour l'étude de quelques propriétés de la peroxydase du raisin : évolution pendant la maturation, variation selon les cépages, localisation dans les différentes parties du fruit, stabilité de l'enzyme dans le raisin détaché du cep.

Cette étude a permis de constater que la peroxydase est présente dans le raisin sous forme soluble et passe dans le jus au cours de l'écrasement du grain. Le raisin en élabore jusqu'à sa pleine maturité ; en surmaturité, l'activité peroxydasique baisse à la fois dans le jus et les parties solides. La teneur en enzyme varie avec le cépage : pour un même cépage, l'activité peroxydasique semble plus importante pour les raisins rouges que pour les raisins blancs.

Dans le jus neutralisé et additionné de polyvinylpyrrolidone, la peroxydase est difficile à détruire. Elle résiste bien à la chaleur, aux inhibiteurs, à l'anhydride sulfureux et à la bentonite.

Dans le jus naturel, en milieu acide, la peroxydase est plus sensible à l'action des inhibiteurs. L'anhydride sulfureux l'inhibe rapidement sans que l'inactivation soit totale, la bentonite réduit son activité de façon sensible, la chaleur détermine une perte d'activité rapide et importante, à partir d'une température critique variable suivant le pH. Le chauffage du raisin représente donc un moyen rapide et efficace d'élimination de la peroxydase.

Mots clés : *raisin, peroxydase.*

INTRODUCTION

Un procédé d'extraction et d'évaluation de la peroxydase du raisin établi précédemment (POUX, OURNAC, 1972) a été utilisé pour l'étude de quelques propriétés de cette enzyme présentant un intérêt au point de vue technologique.

Certains travaux ont déjà été réalisés sur ce sujet et la plupart concernent à la fois polyphénoloxydase et peroxydase.

Dès 1940, Hussein et Cruess ont fait une étude très complète sur la peroxydase du raisin. Ils la différencient d'abord de celle du raifort (*Horse Radish*) par son incapacité à oxyder le résorcinol, puis ils déterminent les effets de l'éthanol, des sucres, des enzymes pectolytiques, du SO_2 et de la chaleur. Par la suite ils établissent sa localisation dans le fruit : la plus grande activité peroxydasique se trouve dans les cellules épidermiques et les faisceaux vasculaires ; le péricarpe montre beaucoup moins d'activité.

Morkovich et Rikter (1964) étudient l'activité enzymatique de la polyphénoloxydase et de la peroxydase de dix-sept variétés de raisins de Moldavie ; ils montrent que cette activité varie avec le cépage, les variétés considérées pouvant être divisées en trois groupes : activité forte, moyenne et faible. Ils ont constaté une inactivation complète des deux enzymes à la température de 78-80°C.

Dobrolyubskii (1937) pulvérise sur des raisins des solutions aqueuses renfermant des traces de Zn, Co ou Cr associés ou de Cu ; ce traitement augmente l'activité de la peroxydase et de la polyphénoloxydase et accélère la maturation.

Gasanov (1964) considère les enzymes oxydatives et pectolytiques dans les variétés de raisin utilisées pour la production de vins de table : dans toutes les variétés, les activités peroxydasique et polyphénoloxydasique augmentent jusqu'à la maturation ; elles sont maximales au début de la maturation.

Les travaux d'Ivanov et Ivanova (1968) sur la polyphénoloxydase et la peroxydase dans les raisins des cépages *Muscat* rouge, *Dimiat*, *Riesling* et *Aligoté* montrent que l'activité de ces deux oxydases dans les différentes parties constitutives du fruit est maximale au moment de la véraison et baisse au fur et à mesure que le raisin mûrit. Dans la période de maturation, l'activité de ces deux enzymes est la plus intense dans les pellicules, puis dans le jus pulpeux, et la moins intense dans le jus clarifié.

Étant donné la discordance de ces résultats, nous avons pensé que des essais pouvaient être entrepris avec la technique de dosage simplifiée mise au point précédemment (Poux, Ournac, 1972) et appliquée aux raisins rouges et blancs cultivés dans le Midi de la France.

On a ainsi envisagé l'étude de l'évolution de l'enzyme au cours du développement du fruit (maturation), de sa variation selon les cépages, de sa répartition dans les différentes parties de la baie, de sa stabilité dans le raisin détaché du cep et de certaines de ses propriétés permettant en particulier de s'assurer de sa présence, de contrôler son activité et le cas échéant de pouvoir l'utiliser. Telle est l'étude de l'influence sur la réaction enzymatique de facteurs comme la température, les antiseptiques, les inhibiteurs, les agents précipitants en vue de procéder à son élimination.

Ces dernières études ont été d'abord effectuées sur des jus élaborés de telle manière que l'enzyme considérée soit à une concentration suffisante pour permettre des comparaisons. Nos essais antérieurs ont établi ces conditions optimales (pH voisin de la neutralité, addition de polyvinylpyrrolidone). Elles sont très éloignées de celles de la pratique.

Aussi avons-nous été amenés à envisager pour cette étude deux séries d'essais, les premiers en milieu neutralisé avec addition de polyvinylpyrrolidone (PVP), puis, dans un deuxième temps, des essais dans les conditions de la vinification.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

Les raisins utilisés appartiennent à plusieurs cépages provenant du vignoble expérimental du domaine de Pech-Rouge, I. N. R. A., Narbonne.

Les techniques d'échantillonnage du raisin, d'extraction et de dosage de la peroxydase sont décrites dans un mémoire précédent (POUX, OURNAC, 1972).

Les essais du § 5-1 ont été réalisés sur des jus neutralisés et additionnés de PVP pour éliminer l'influence inhibitrice des acides et des tanins sur la peroxydase ; on détermine ainsi les propriétés de cette enzyme à un pH voisin de 6,5.

Pour établir la localisation de la peroxydase dans le fruit, les déterminations sont effectuées séparément sur le jus, la pulpe et les pellicules. Les pellicules sont détachées au moyen d'une pince, broyées dans un mixer avec un tampon pH 7 (phosphate 0,02 M), puis centrifugées, broyage et centrifugation étant répétés deux fois. On utilise 200 ml de tampon pH 7 pour les pellicules de 100 grains.

Le raisin pelé est broyé au mixer et centrifugé après neutralisation et addition de PVP. Le culot restant après centrifugation, qui représente les membranes des cellules de la pulpe, est aussi repris et épuisé par 100 ml de tampon pH 7 (phosphate 0,02 M).

RÉSULTATS

1. — *Stabilité de la peroxydase du raisin* (tabl. 1)

Cette étude a été réalisée à partir de *Grenache*. L'activité peroxydasique du jus de raisin a été déterminée après un séjour du fruit entier à une température de + 5°C pendant 15 jours. On a constaté une perte de l'activité enzymatique de 10 à 15 p. 100. Étant donné le pourcentage de variation susceptible de provenir de l'échantillonnage (POUX, OURNAC, 1971), cette perte est faible.

TABLEAU I

Peroxydase dans les raisins conservés 15 jours à + 5°C

Activité exprimée en µl d'O_2/mn

	Vol. jus de 100 grains (ml)	Activité dans 1 ml de jus	Activité totale du jus de 100 grains	Perte p. 100 de l'activité totale du jus	Perte p. 100 de l'activité de 1 ml de jus
Grenache blanc					
Témoin	76	45,9	3 488		
Conservé	70	45,1	3 157	9,5	1,7
Grenache noir					
Témoin	66	50,2	3 313		
Conservé	68	41,9	2 849	14	16,5

2. — *Répartition de la peroxydase dans le fruit* (tabl. 2)

Des dosages de l'activité de la peroxydase ont été réalisés séparément sur le jus, la pulpe et les pellicules, ou bien sur le jus d'une part et le culot représentant la somme (pulpe + pellicule) d'autre part. Ces essais ont été effectués sur des raisins au stade maturité.

TABLEAU 2

Répartition de la peroxydase dans le raisin mûr

Activité peroxydasique exprimée en µl d'O_2/mn/100 grains

Cépage		Jus	Pulpe	Pellicules	Total
Terret gris	Activité	6 030	1 436	416	7 882
	P. 100 de l'activité totale de 100 grains	76,5	18,2	5,3	
Gros-Vert	Activité	7 466	1 952	688	10 106
	P. 100 de l'activité totale de 100 grains	74	19,3	6,8	
Listan	Activité	4 244	1 608	1 722	7 574
	P. 100 de l'activité totale de 100 grains	56	21,2	22,8	
Servant	Activité	6 248	1 320	1 838	9 406
	P. 100 de l'activité totale de 100 grains	66,4	14	19,6	
Carignan rouge n° 2	Activité	3 400	1 593	1 953	6 946
	P. 100 de l'activité totale de 100 grains	49	23	28	

On s'aperçoit que le jus renferme 49 à 76 p. 100 de la peroxydase du fruit et que les constituants solides se partagent à peu près également les 51 à 24 p. 100 restants. La plus grande partie de la peroxydase du raisin se trouve donc sous forme soluble et passe dans le jus lors de l'écrasement du grain. Ces résultats concordent avec ceux obtenus au cours de l'étude sur la centrifugation : la majeure partie de la peroxydase étant sous forme soluble, l'augmentation de la vitesse de centrifugation influe très peu sur la teneur du jus en cette enzyme.

3. — *Peroxydase du raisin au cours de la maturation* (tabl. 3)

On a considéré deux cépages différents et, pour chacun, deux couleurs de fruit : *Carignan* blanc et rouge, *Grenache* blanc et rouge. Pour les deux *Carignan*, les premiers prélèvements coïncident avec la demi-véraison, pour les deux *Grenache* ils correspondent à la fin de la véraison. La teneur en peroxydase de 1 ml de jus varie peu entre la véraison et la maturité, mais toujours dans le sens d'une légère augmentation. Celle-ci,

TABLEAU 3

Activité peroxydasique au cours de la maturation
(exprimée en µl d'O_2/mn)

Dates	Poids de 100 grains	Acidité totale du jus (méq/litre)	Activité par ml de jus	Activité totale du jus de 100 grains	Activité du culot	Activité totale de 100 grains
			Carignan rouge			
17-8-70	156	270	41,1	2 507		
24-8-70	191	200	33	3 036		
31-8-70	210	163	36,2	3 800		
7-9-70	213	140	40,8	4 202	3 101	7 303
14-9-70	230	113	50,5	4 444	4 250	8 694
21-9-70	237,6	102	55,1	5 510	4 594	10 104
28-9-70	229	92	57,7	5 770	4 738	10 508
5-10-70	229	86	48,8	5 077	3 791	8 868 (?)
14-10-70 (raisins moisis)	225	80	45,4	4 722	5 743	10 465
			Carignan blanc			
18-8-70	184	235	29,6 (?)	2 812		
25-8-70	206	190	23,5	2 232		
1-9-70	217	152	23,3	2 423		
8-9-70	218	126	26,4	2 640	2 642	5 282
			Grenache noir			
20-8-70	146	123	50,8	2 845		
26-8-70	153	104	56	3 472		
2-9-70	165	88	49,4	3 013		
9-9-70	164,5	79	50,2	3 313	3 216	6 529
			Grenache blanc			
20-8-70	160	138	36,2	2 197		
26-8-70	173	114	45,7	3 016		
2-9-70	184	96	43,7	2 840		
9-9-70	185,4	80	46,2	3 511	4 135	7 646

exprimée en µl d'O_2/mn/ml, s'élève à 24 pour le *Carignan* rouge, 3 pour le *Carignan* blanc, 0 pour le *Grenache* rouge et 10 pour le *Grenache* blanc. Si l'on considère l'activité totale du jus de 100 grains, valeur qui n'est pas influencée par la dilution dont la baie est le siège, on constate d'une façon générale une augmentation jusqu'à la maturité.

Les dosages réalisés parallèlement sur les constituants solides dans le cas du *Carignan* rouge montrent l'augmentation constante de leur activité peroxydasique tout au long de la maturation. Il apparaît donc que le raisin continue à élaborer de la peroxydase jusqu'à sa pleine maturité.

Pour le *Carignan* rouge, nous avons poursuivi les prélèvements jusqu'à un stade de surmaturation assez avancé, ce qui nous a permis de constater une baisse sensible de l'activité peroxydasique du fruit après maturation (maturité atteinte le 28-09-70), cette baisse se manifestant à la fois dans le jus et dans les parties solides.

4. — *Peroxydase de différents cépages* (tabl. 4)

TABLEAU 4

Activité peroxydasique de différents cépages à maturité

Activité exprimée en µl d'O_2/mn

Cépage	Jus			Culot		Activité totale de 100 grains	Activité de 100 g de fruits
	Activité de 1 ml de jus	Activité du jus de 100 grains	P. 100 de l'activité totale de 100 grains	Activité du culot de 100 grains	P. 100 de l'activité totale de 100 grains		
Grenache blanc ...	46,2	3 511	45,9	4 135	54,1	7 646	4 124
Grenache rouge ..	50,2	3 313	53,2	3 216	46,8	6 229	3 787
Aramon	56,3	14 634	56	11 487	44	26 121	4 353
Cinsault	41,6	10 327	66	5 284	34	15 611	3 540
Mourvèdre	42,5	3 995	51,3	3 790	48,7	7 785	2 639
Clairette blanche .	34	2 304	47,7	2 527	52,3	4 831	2 300
Clairette rose	27,7	2 382	51,5	2 240	48,5	4 622	2 073
Clairette grise	35	2 625	49,1	2 699	51	5 324	2 334
Terret blanc	32	4 976	56,2	3 877	43,8	8 853	2 305
Terret gris	26,4	5 068	70	2 182	30	7 250	1 768
Hybride blanc ... SV. 12 375	47,7	7 155	47	8 041	53	15 196	4 763
Gros-Vert	42,5	11 900	74,2	4 135	25,8	16 035	3 107
Carignan blanc ..	26,4	2 640	50	2 642	50	5 282	2 423
Carignan rouge ..	57,7	5 770	55	4 738	45	10 508	4 589

L'activité peroxydasique des constituants liquides et solides de raisins de différents cépages à maturité à été déterminée. On trouve dans les jus des différences importantes, l'activité peroxydasique variant de 26 à 57 µl d'oxygène par ml/mn. Les résultats rapportés à 100 g de fruit entier sont eux aussi très différents, ils s'échelonnent entre 1 700 et 4 700 µl/mn.

La teneur en peroxydase varie d'abord avec le cépage, les trois *Clairette* ont des teneurs faibles, ainsi que les deux *Terret*, alors que les deux *Grenache* ont des teneurs plus élevées. On peut dire aussi que certains cépages sont plus peroxydables que d'autres ; l'*Aramon*, le *Carignan* rouge, l'hybride blanc *Seyve-Villard 12 375* font partie de cette catégorie. D'autre part, l'activité peroxydasique paraît plus importante pour les jus rouges que pour les jus blancs : *Carignan* blanc et rouge, 26 et 57 µl/ml/mn, *Grenache* blanc et rouge, 45 et 50 µl/ml/mn.

5. — *Propriétés de la peroxydase du raisin*

5. 1. *En milieu neutralisé et en présence de PVP.*

a) *Conservation de la peroxydase dans le jus* (tabl. 5).

Du jus de raisin a été placé dès son élaboration à plusieurs températures : — 15°C, + 20°C (température du laboratoire) et + 35°C. Les dosages ont été réalisés après 8 heures et 3 jours.

TABLEAU 5

Peroxydase dans le jus de raisin conservé à différentes températures
Activité exprimée en µl d'O_2/mn/ml de jus

	Jus témoin	Durée de conservation					
		8 heures			3 jours		
		Température de conservation					
		+ 20°C	+ 35°C	— 15°C	+ 20°C	+ 35°C	— 15°C
Activité peroxydasique	36,2	37,9	36,2	37,9	38,2	38,4	40,2

On n'a noté dans aucun cas une diminution de l'activité peroxydasique. Au bout de 3 jours, on observe même une légère augmentation de cette activité. Ce phénomène peut s'expliquer par une libération de peroxydase précédemment liée à des particules.

b) *Action de la chaleur* (fig. 1).

Le jus de raisin a été maintenu pendant des temps différents à plusieurs températures : + 40, + 50, + 60, + 70 et + 80°C.

La peroxydase paraît bien résister à l'action de la chaleur, son altération est relativement faible et lente jusqu'à + 70°C ; après 1 heure à + 70°C, la moitié seulement de son activité est détruite ; la perte d'activité s'accélère au-delà de cette température et à + 80°C on assiste à une inactivation totale.

La courbe représentant, en coordonnées semi-logarithmiques, l'activité peroxydasique résiduelle après traitement par la chaleur, est constituée de deux segments dont le point d'intersection correspond à la température où l'enzyme devient sensible à l'action thermique ; il se situe autour de 68°C qui est le point critique d'inactivation

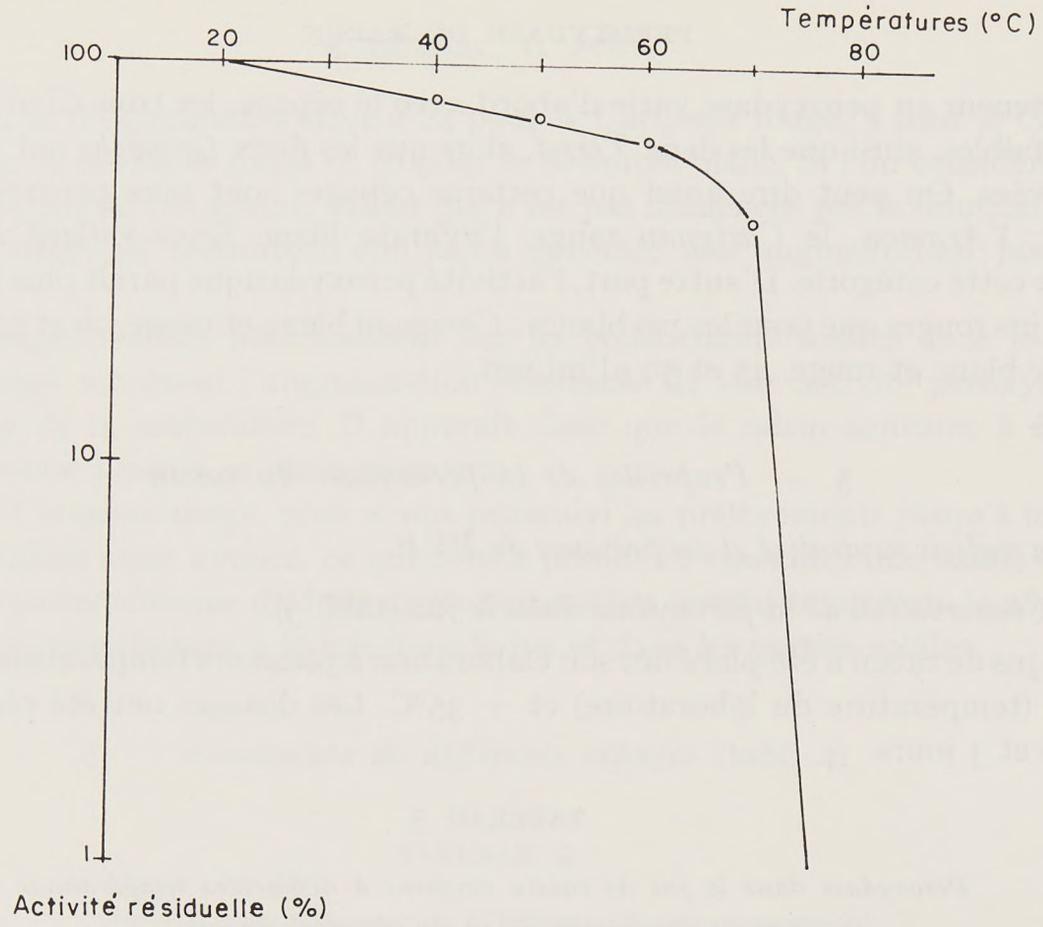


FIG. 1. — *Influence de la chaleur sur la peroxydase du jus de raisin. Après* 30 *mn de chauffage*

TABLEAU 6

Action du NaN_3 sur la peroxydase du jus de raisin

Activité peroxydasique exprimée en µl d'O_2/mn/ml de jus
(Jus neutralisé, additionné de PVP)

Cépage	Jus témoin	Concentration en NaN_3 dans le milieu réactionnel						
		$3{,}85 \cdot 10^{-5}$ M	$7{,}69 \cdot 10^{-5}$ M	$1{,}54 \cdot 10^{-4}$ M	$7{,}69 \cdot 10^{-4}$ M	$1{,}54 \cdot 10^{-3}$ M	0,002 M	0,01 M
Carignan rouge	41,6	18,9						
Perte (%)		54,6						
Carignan rouge	46,5	20,9	18,4					
Perte (%)		54,2	60,4					
Carignan blanc	52,2	20	11,4					
Perte (%)		61,7	78,2					
Grenache blanc	52,5	12,9				8,6		
Perte (%)		75,4				83,4		
Gros-Vert	42,4						32	18
Perte (%)							24,3	57,4
Jus naturel								
Carignan rouge	36,2	29,6	27	23,2	15,5			6,6
Perte (%)		18,2	25,4	35,9	57,2			81,8

TABLEAU 7

Action du SO_2 sur la peroxydase du jus de raisin

Temps de conservation	Essais	SO_2 (mg/litre)			Activité de 1 ml de jus (µl d'O_2/mn)	Perte (%)
		Total	Libre	Combiné		
	Raisins broyés avec PVP ; Gros-Vert					
Temps 0	T	0			36	
	n° 1	100				
	n° 2	200				
Après 26 jours	T				36	0
	n° 1	39	13	26	33	8
	n° 2	125	38	87	28	22
Après 46 jours	T				23	36
	n° 1	13	13	0	17	53
	n° 2	64	32	32	15	58
Après 67 jours	T				17	53
	n° 1	13	6	7	10	72
	n° 2	64	19	45	12	66
	Raisins broyés avec PVP ; Servant					
Temps 0	T	0			67,5	
	n° 1	173				
	n° 2	505				
	n° 3	825				
Après 3 jours	T				67,5	0
	n° 1	1470	90	57	52,5	22
	n° 2	486	320	166	51	24
	n° 3	794	614	180	54	19
Après 12 jours	T	0			67,5	0
	n° 1	135	32	103	47,5	30
	n° 2	467	224	243	45	33
	n° 3	742	460	282	49,5	27
Après 18 jours	T	0			67,5	0
	n° 1	128	20	108	48	28
	n° 2	448	25	223	44	36
	n° 3	730	313	417	48	28
Après 38 jours	T	0			29,5	56
	n° 1	120	6	114	25,8	62
	n° 2	440	13	327	28	58
	n° 3	700	20	680	30	55

de la peroxydase du raisin ; on observe le même phénomène au cours des réactions de dénaturation d'autres protéines (PONTING, 1960).

Pour une même température, la durée du chauffage influe peu jusqu'à cette température critique ; au-delà, la destruction augmente rapidement avec le temps d'action de la chaleur.

Ces résultats se rapprochent de ceux obtenus par DEMEAUX et BIDAN (1967) pour la polyphénoloxydase du jus de raisin.

c) *Action des inhibiteurs* (tabl. 6).

Le groupement prosthétique de la peroxydase étant constitué par une ferroporphyrine, on a testé les possibilités d'inhibition par l'azoture de sodium qui a la propriété de bloquer les métaux (fer et cuivre). Nous l'avons fait agir à différentes concentrations dans le milieu réactionnel.

TABLEAU 8

Action du SO_2 sur la peroxydase du jus de raisin
Raisins broyés sans PVP — *Servant*

Temps de conservation	Essais	SO_2 (mg/litre)			Activité de 1 ml de jus (μl d'O_2/mn)	Perte (%)
		Total	Libre	Combiné		
Temps 0	Témoin	0			30	
	n° 1	166				
	n° 2	474				
	n° 3	787				
Après 3 jours	Témoin	0			25	17
	n° 1	147	107	40	24	23
	n° 2	410	300	110	25	17
	n° 3	698	573	125	25	17
Après 12 jours	Témoin	0			25	17
	n° 1	120	52	68	22	26
	n° 2	390	250	140	23	23
	n° 3	670	505	165	25	17
Après 18 jours	Témoin	0			25	17
	n° 1	110	25	85	23	23
	n° 2	378	153	225	21	30
	n° 3	659	410	249	16,5	47
Après 38 jours	Témoin	0			12	60
	n° 1	100	13	87	6,5	80
	n° 2	370	38	332	5	83
	n° 3	615	95	520	3,7	86

L'inhibition par l'azoture de sodium n'est jamais complète et varie avec le cépage dont on a extrait la peroxydase. Dans la plupart des cas, l'inhibition ne dépasse pas 80 p. 100 pour une concentration en azoture dans le milieu réactionnel de

$1{,}54 \cdot 10^{-3}$ M. La peroxydase du *Gros-Vert* paraît plus résistante, une concentration de 0,01 M de NaN_3 provoque une inhibition de 57 p. 100 seulement ; une différence avec le cépage apparaît donc dans ces essais.

d) *Action de l'anhydride sulfureux* (tabl. 7 et 8 ; fig. 2).

Hussein et Cruess (1940) ont observé, pour la peroxydase du raisin, une diminution progressive de l'activité enzymatique lorsque la concentration en SO_2 augmente ; ils utilisent jusqu'à 5,58 p.p.m. de SO_2. Ces auteurs pensent que SO_2 affaiblit l'enzyme, soit en réagissant directement avec elle, soit en augmentant la concentration en ions H ; d'après eux, l'enzyme n'est jamais complètement détruite.

Il était donc intéressant de se demander si le SO_2, en dehors de son action sur H_2O_2, avait une action particulière sur la peroxydase elle-même, au sein du jus de raisin. Pour cela, à des jus de raisin obtenus après neutralisation et additionnés ou non de PVP (pH 6,5), on a ajouté des doses variables de SO_2 (100, 200, 600 et 800 mg/l) et on a suivi au cours du temps l'évolution de l'activité peroxydasique. Les jus étaient conservés à + 5°C. Les dosages ont été réalisés, en ce qui concerne la concentration en H_2O_2, en tenant compte du SO_2 se trouvant dans le jus : dans nos conditions opératoires, H_2O_2 était toujours en grand excès sur SO_2 présent.

Les résultats obtenus entraînent les observations suivantes.

L'évolution, au cours du temps, de l'activité peroxydasique montre une période de stabilité de 18 jours environ, puis dans tous les cas une perte d'activité très sensible au 38e jour due vraisemblablement à la dénaturation de l'enzyme, celle-ci s'effectuant aussi bien en présence qu'en l'absence de SO_2, de même qu'avec ou sans PVP.

La figure 2 confirme l'action de la PVP, essais 1 et 3, par rapport aux essais 2 et 4 sans PVP. Dans les deux cas, avec ou sans SO_2, la protection de la peroxydase est évidente.

Dans les essais avec SO_2 (3 et 4), on observe dans les deux cas l'effet dépressif sur l'activité apporté par cet inhibiteur. Toutefois, alors que dans l'essai (3) avec PVP l'abaissement est notable, dans l'essai (4) sans PVP la diminution est beaucoup moins importante, comme si les polyphénols présents dans ce dernier cas fixaient SO_2 à la place de l'enzyme.

Les tableaux 7 et 8 montrent en outre que pour chaque série d'essais il n'y a guère de proportionnalité entre les doses de SO_2 ajoutées et la perte de l'activité enzymatique. Tout semble donc se passer comme si une faible dose de SO_2 provoquait une altération de la peroxydase, alors que des doses de SO_2 supérieures à un certain seuil avaient peu d'action.

e) *Action de la bentonite* (tabl. 9).

On admet généralement que la bentonite adsorbe les oxydases du jus de raisin et les entraîne dans le dépôt qu'elle forme (Milisavljevic, 1963). On a ajouté à un jus de raisin de la bentonite à raison de 0,5 et 1 g par litre, doses utilisées dans la pratique. Les jus étaient conservés au repos après traitement à basse température (+ 5°C) pour éviter le départ de la fermentation. Les dosages effectués au bout de 1 jour, 8 jours et 1 mois sur les jus centrifugés n'ont mis en évidence qu'un très léger affaiblissement de l'activité peroxydasique.

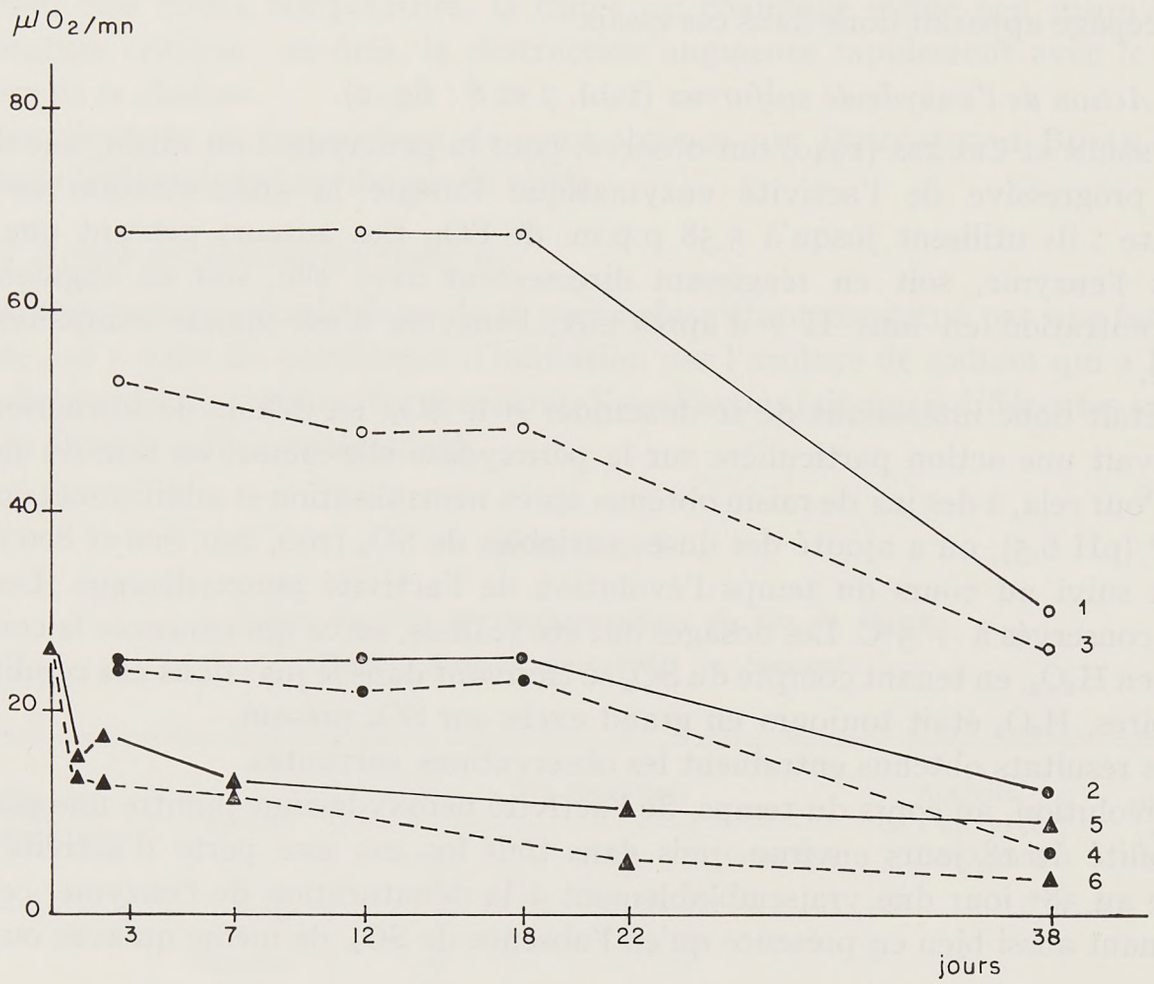


FIG. 2. — *Action du SO_2*

○———○ Jus neutralisé + PVP
○- - - - - - -○ Jus neutralisé + PVP + SO_2
●———● Jus neutralisé
●- - - - - - -● Jus neutralisé + SO_2
▲———▲ Jus
▲- - - - - - -▲ Jus + SO_2

TABLEAU 9

Action de la bentonite sur la peroxydase du jus de raisin neutralisé
Activité peroxydasique exprimée en µl d'O_2/mn/ml de jus

Bentonite ajoutée (g/litre)	Jus témoin	Après repos de		
		1 jour	8 jours	1 mois
0,5	25,8	23	25	25
1,0	25,8	23	25	23

Dans les conditions de l'expérience, c'est-à-dire pH voisin de la neutralité, on peut penser que les protéines présentes chargées négativement, donc de même électroactivité que la bentonite, ne floculent pas avec cette dernière.

5. 2. *En milieu acide.*

a) *Conservation de l'activité peroxydasique du jus de raisin naturel* (tabl. 10).

Des jus de raisin provenant de deux cépages différents ont été placés dès leur élaboration en chambre froide à + 5°C.

TABLEAU 10

Conservation de l'activité peroxydasique dans les jus de raisin naturels
Température de conservation + 5°C
Pourcentage de perte de l'activité enzymatique de 1 ml de jus

Cépage	Durée de conservation en jours										
	1	2	3	6	7	11	22	23	38	45	59
	a) *Température de conservation + 5°C*										
Gros-Vert	12,5		15	21							
Gros-Vert			8			29		55		71	
Carignan rouge	38	30			48		59		65		67
Carignan rouge	7			32							
	b) *Température de conservation + 20°C*										
Gros-Vert	12	12	24	25							

Contrairement aux résultats obtenus avec les jus neutralisés et additionnés de PVP, l'activité peroxydasique diminue très rapidement. La diminution est plus rapide dans les jus rouges (— 32 p. 100 de l'activité initiale au sixième jour de conservation) que dans les jus blancs (— 21 p. 100) ; les jus plus riches en matières tannoïdes subissent donc une plus grande inactivation. De plus, pour un même jus, la perte d'activité est plus rapide lorsqu'il est conservé à la température du laboratoire (+ 20°C) que lorsqu'il est conservé en chambre froide à +5°C.

b) *Action de la chaleur sur le jus* (tabl. 11 ; fig. 3).

Le jus de raisin a été maintenu pendant des temps différents à plusieurs températures : + 40, + 50, + 60°C. On constate que, pour une même température, la perte d'activité est proportionnelle à la durée du chauffage ; en outre, pour une même durée de chauffage, la perte d'activité croît en fonction de la température ; 15 minutes à 60°C suffisent à détruire entièrement la peroxydase.

La durée du chauffage étant fixée à 10 minutes, on a étudié l'action de plusieurs températures pour différents pH du jus.

Les courbes (fig. 3), représentant en coordonnées semi-logarithmiques l'activité peroxydasique résiduelle après un traitement thermique, permettent de déterminer

TABLEAU II

Action de la chaleur sur le jus de raisin naturel

Activité exprimée en µl d'O_2/mn/ml de jus

	Jus témoin à 20°C	15 mn à 40°C	30 mn à 40°C	1 heure à 40°C	15 mn à 50°C	30 mn à 50°C	15 mn à 60°C
Activité peroxydasique	13	10,5	9	7	2,9	0,9	0
Activité résiduelle (%)		80	69	54	22	7	0

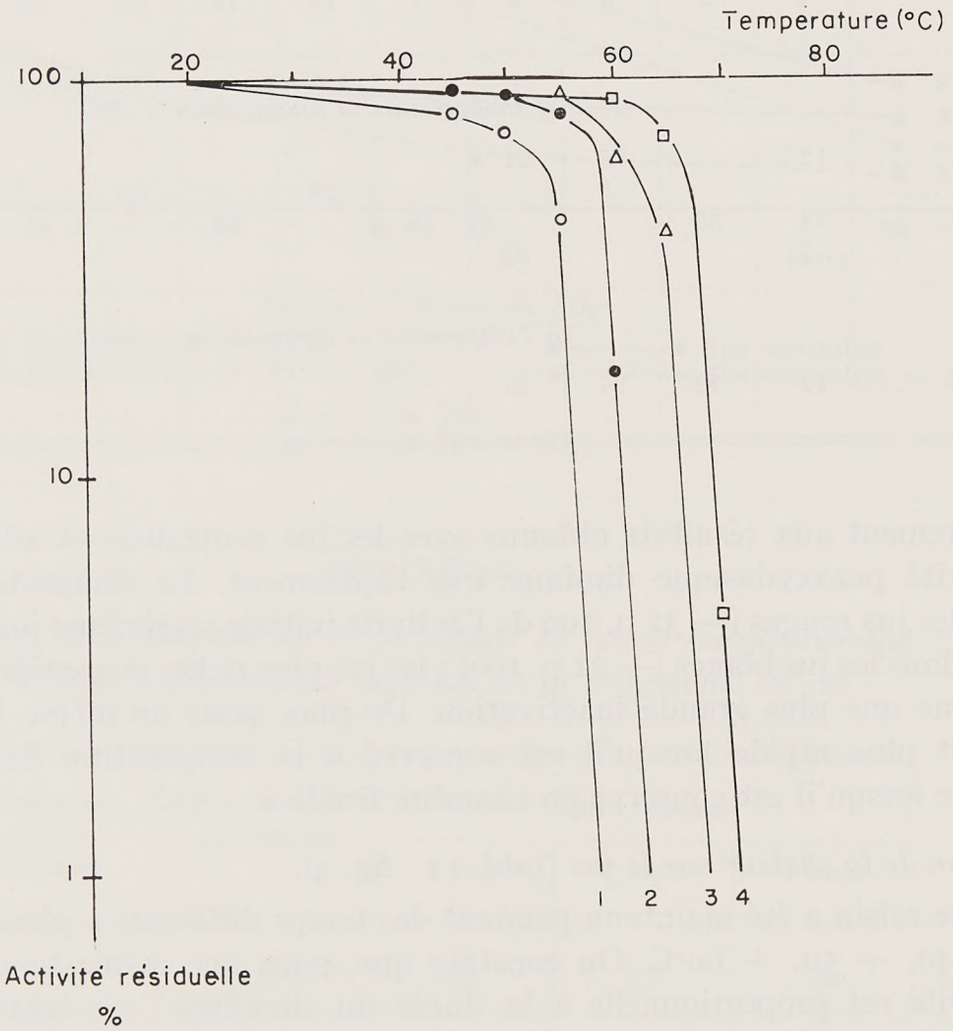


Fig. 3. — *Influence de la chaleur sur la peroxydase du jus de raisin*

(Durée de chauffage : 10 mn)

1 ○——○ Jus à pH = 3,3
2 ●——● Jus à pH = 3,5
3 △——△ Jus à pH = 3,7
4 □——□ Jus à pH = 3,9

les températures d'inactivation de la peroxydase en fonction du pH du milieu. Cette température passe de 54°C à pH 3,3 à 68°C pour un pH de 3,9.

c) *Action de la chaleur sur le raisin foulé* (tabl. 12).

Cette action est mise à profit dans la technique de chauffage de la vendange foulée avant pressurage. Ce procédé d'amélioration des jus et des vins tend actuellement à se généraliser pour différentes motivations dont la principale, suppression du décuvage, est complétée entre autres par une augmentation de la dissolution des matières colorantes et la destruction de certaines enzymes.

TABLEAU 12

Action de la chaleur sur le raisin foulé

Activité peroxydasique exprimée en µl d'O_2/mn/ml de jus
(température 67-70°C pendant 4 mn)

Cépages	Jus de goutte + Jus de presse		Perte (%)	Jus de goutte		Perte (%)
	avant chauffage	après chauffage		avant chauffage	après chauffage	
Clairette blanche	6,2	0	100	6,3	0,6	90,5
Carignan rouge 10-10-70	27	3,2	88	39,5	2,9	92,6
Carignan rouge 14-10-70				18,7	14,8	22
Cinsault	4,2	0,6	86	5,9	0,1	98

Guinot et Menoret (1965), dans une étude sur le chauffage continu du raisin avant pressurage, ont montré que la polyphénoloxydase et la peroxydase ne sont totalement détruites qu'aux températures supérieures à + 70°C et pour une durée de 5 minutes.

Au cours d'expérimentations sur un appareil semi-industriel (cave expérimentale de Pech-Rouge, I. N. R. A., Narbonne), on a étudié le comportement de la peroxydase au cours de cette opération.

Les raisins égrappés traversent un « calefacteur » qui permet de les amener à une température déterminée par réglage du débit de vapeur et de les y maintenir pendant des durées variables par réglage du débit de l'alimentation.

Les dosages ont été faits d'une part sur des lots de raisins prélevés immédiatement avant et après traitement, le temps de passage étant déterminé à l'avance, et d'autre part à différentes phases de l'opération, qui comporte non seulement le chauffage proprement dit mais aussi les étapes de macération et de pressurage.

La perte d'activité enzymatique est importante et rapide. Au bout de 4 minutes de chauffage à 67-70°C, elle dépasse 86 p. 100 dans le cas du mélange jus de goutte

+ jus de presse ; dans les mêmes conditions, elle est supérieure à 90 p. 100 dans le jus de goutte. Dans un essai sur *Carignan* rouge, elle n'a été cependant que de 22 p. 100 sans que l'on ait trouvé d'explication.

Le chauffage du raisin se révèle donc un moyen rapide et efficace d'élimination de la peroxydase du jus de raisin.

d) *Action de l'azoture de sodium* (tabl. 6).

On a utilisé l'azoture de sodium à différentes concentrations. Pour une même concentration et un même cépage, le *Carignan* rouge, l'activité peroxydasique est la plus élevée dans le jus naturel sans PVP.

TABLEAU 13

Action de SO_2 sur la peroxydase du jus de raisin naturel, cépage Gros-Vert

Temps de conservation	Essais	SO_2 (mg/l)		Activité de 1 ml de jus (μl d'O_2/mn)	Perte (%)
		Total	Libre		
Temps 0	Témoin	0		14,5	
	n° 1	88			
	n° 2	474			
	n° 3	825			
après 3 jours	T	0		13,3	8
	n° 1	93,5	41	11,9	18
	n° 2	479	193	12,2	16
	n° 3	819	368,5	12,6	13
après 11 jours	T	0		10,3	29
	n° 1	93,5	37,5	7,5	48
	n° 2	474	199	9,5	34
	n° 3	830	374	9,8	32
après 23 jours	T	0		6,5	55
	n° 1	91,5	35	4,5	69
	n° 2	468	201	7	52
	n° 3	824,9	370	6,9	53
après 45 jours	Témoin	0		4,2	71
	n° 1	88	31,5	3,6	75
	n° 2	468	207	7,2	50
	n° 3	813	374	7,7	47

e) *Action de l'anhydride sulfureux* (tabl. 13 et 14 ; fig. 2).

Des jus de raisin élaborés à partir des cépages *Carignan* rouge et *Gros-Vert* ont été additionnés de doses croissantes de SO_2 ; puis on a suivi au cours du temps les variations de l'activité enzymatique dans ces jus conservés à + 5°C.

On constate que, pendant les premiers jours, l'activité enzymatique diminue plus rapidement et davantage dans les essais sulfités que dans les témoins. Puis, au bout de deux jours, cette activité diminue moins et sensiblement avec la même

vitesse dans le témoin et dans l'essai sulfité (fig. 2, courbes 5 et 6). On peut en conclure que SO_2 inhibe très rapidement la peroxydase sans toutefois que l'inhibition soit totale.

TABLEAU 14

Action du SO_2 sur la peroxydase du jus de raisin naturel Carignan *rouge*

Temps de conservation	Essais	SO_2(mg/l)		Activité de 1 ml de jus (μl d'O_2/mn)	Perte (%)
		Total	Libre		
Temps 0	T	0		26	
	n° 1	180			
	n° 2	380			
	n° 3	620			
	n° 4	885			
après 2 jours	T	0		18	30
	n° 1	164	88	13	48
	n° 2	370	211	15	41
	n° 3	597	322	15	41
	n° 4	877	474	16	39
apres 7 jours	T	0		13,6	48
	n° 1	160	88	12	54
	n° 2	363	199	12,3	53
	n° 3	585	322	13,3	49
	n° 4	875	468	14,0	46
après 22 jours	T	0		10,6	59
	n° 1	152	76	6	77
	n° 2	363	175,5	7,9	70
	n° 3	550	269	8,5	67
	n° 4	877	427	8,6	67
après 38 jours	T	0		9,2	65
	n° 1	146	72,5	3,9	85
	n° 2	345	172	6,3	76
	n° 3	550	275	6,2	76
	n° 4	825	404	8,2	68

On constate également que, pour chaque série, la perte d'activité de la peroxydase est la plus élevée pour les doses les plus faibles de SO_2 utilisées. Tout se passerait donc comme si une faible dose de SO_2 était suffisante pour agir sur la peroxydase ; lorsque la dose de SO_2 dépasse un certain seuil, le SO_2 atténuerait l'action inhibitrice due aux tanins.

f) *Action de la bentonite* (tabl. 15).

Un jus de raisin, cépage *Gros-Vert*, a été collé à la bentonite à raison de 0,5 et 1 g/l. Une partie du lot a été conservée au repos, après traitement, à température ambiante (20°C), l'autre placée en chambre froide (+ 5°C). Au bout de 24 heures, on observe une nette diminution de l'activité enzymatique ; la perte d'activité est plus importante dans les jus conservés à température ambiante que dans ceux conservés à + 5°C.

On remet alors le dépôt en suspension. Trois jours après le traitement à la bentonite, on enregistre une nouvelle diminution de l'activité enzymatique.

Entre le troisième et le sixième jour, la diminution d'activité peroxydasique, pour les essais traités à la bentonite et conservés au froid, est du même ordre de grandeur que pour l'essai témoin. Cette perte d'activité est vraisemblablement due, non plus à l'action de la bentonite, mais à la dénaturation de l'enzyme elle-même.

TABLEAU 15

Action de la bentonite sur la peroxydase du jus de raisin

Cépage utilisé : *Gros-Vert* ; pH du jus : 3,2
Activité peroxydasique exprimée en µl d'O_2/mn/ml de jus

Temps de conservation		Jus conservé à + 20°C			Jus conservé à + 5°C		
		Témoin	Bentonite 0,5 g/l	Bentonite 1 g/l	Témoin	Bentonite 0,5 g/l	Bentonite 1 g/l
Temps 0	Activité	13,2			13,6		
1 jour	Activité	11,6	5,7	4,3	11,9	9,2	8,5
	Perte (%)	12	57	67	12,5	32	37,5
2 jours	Activité	11,6					
	Perte (%)	12					
3 jours	Activité	10	2,6	1,6	11,5	6,2	4,6
	Perte (%)	24	80	88	15	54	66
6 jours	Activité	Non dosé (moisissures à la surface du jus)			10,8	5	3,7
	Perte (%)				21	63	73

g) *Influence du pressurage sur la teneur du jus de raisin en peroxydase.*

Il était intéressant de connaître l'influence du pressurage sur la teneur du jus de raisin en peroxydase dans le cas du *Mauzac*, cépage de base du vin mousseux « Blanquette de Limoux ». On a déterminé l'activité enzymatique dans le jus de goutte (cuvée) et dans le jus de presse (taille) sur des échantillons prélevés à deux postes différents de la chaîne de pressurage. Exprimée en µl d'oxygène par minute et par ml de jus, cette activité est de 9,2 et 4,3 respectivement dans les jus de goutte 1 et 2 ; elle est de 20,7 et 13,7 dans les jus de presse correspondants.

On constate donc que, pour les deux essais, l'activité peroxydasique est beaucoup plus importante (plus du double) dans le jus de presse que dans le jus de goutte.

CONCLUSION

Notre étude permet de mettre en évidence certaines propriétés de la peroxydase du raisin ; les unes sont en concordance avec les données de la littérature, mais d'autres sont en contradiction.

La plus grande partie de la peroxydase est présente dans le raisin sous forme soluble et passe dans le jus au cours de l'écrasement du grain.

Le raisin élabore de la peroxydase jusqu'à sa pleine maturité ; en surmaturité, l'activité peroxydasique baisse à la fois dans le jus et les parties solides.

La teneur en peroxydase varie avec le cépage ; dans nos essais et pour un même cépage, l'activité peroxydasique paraît être plus importante pour les rouges que pour les blancs.

Dans le jus de raisin neutralisé et additionné de PVP, la peroxydase est une enzyme difficile à détruire. Elle résiste bien à la chaleur, jusqu'à une température critique voisine de 68°C, pour une durée d'action de 10 minutes ; au-delà, elle est rapidement détruite. Pour une même température, la durée de chauffage influe peu jusqu'à la température critique ; au-delà, l'activité enzymatique baisse rapidement lorsqu'augmente la durée du chauffage.

Elle résiste bien aux inhibiteurs, SO_2 ne l'altère que faiblement, la bentonite a peu d'action.

Dans le jus naturel, en milieu acide, elle est plus sensible à l'action des inhibiteurs; SO_2 l'inhibe très rapidement, même à faible dose, sans que l'inactivation soit totale ; la bentonite réduit de façon sensible son activité.

Sous l'action de la chaleur, la perte d'activité enzymatique est rapide et importante, à partir d'une température critique. De plus, pour un même temps d'action, l'abaissement du pH détermine un abaissement de la température d'inactivation. Le chauffage du raisin représente donc un moyen efficace d'élimination de la peroxydase.

Reçu pour publication en janvier 1974.

SUMMARY

PEROXYDASE OF THE GRAPE. RESEARCH OF SOME PROPERTIES

An extraction and valuation technique, designed by the authors, was used to study some properties of grape peroxydase : evolution during maturation, variation in different vine-plants, localization in the different parts of the fruit and stability of the enzyme in grapes separated from the plant.

From this study, it could be established that peroxydase is present, in soluble form, in the grape and enters the juice during crushing of the grape. It is elaborated by the grape until the latter reaches full maturity, after which peroxydasic activity decreases in both the juice and solid parts. The enzyme content varies with different vine-plants ; in any one plant, peroxydasic activity seems greater in red grapes than in white grapes.

In neutralized juice with polyvinylpyrrolidone, peroxydase is difficult to destroy. It is highly resistant to heat, inhibitors, sulphur dioxide and bentonite.

In natural juice, in an acid medium, peroxydase is more sensitive to the effect of inhibitors. Sulphur dioxide causes rapid inhibition without total inactivation ; bentonite gives rise to an appreciable reduction in activity ; heat, above a critical temperature, variable according to pH, brings about a rapid and large drop in activity. Therefore, heating of the grape represents a quick and effective means of eliminating peroxydase.

RESUMEN

LA PEROXIDASA DE LA UVA. ESTUDIO DE ALGUNAS PROPIEDADES

Se ha utilizado un procedimiento de extracción y de evaluación, creado por los autores, para el estudio de algunas propiedades de la peroxidasa de la uva : evolución durante la maduración, variación según el género de cepas, localización en las distintas partes del fruto y estabilidad del enzima en la uva una vez desprendida de la cepa.

Este estudio ha permitido comprobar que la peroxidasa se encuentra presente en la uva, en forma soluble, y pasa en el zumo durante el transcurso del aplastamiento del grano. La elaboración de este cuerpo en la uva se prosigue hasta alcanzar plena madurez. En sobremadurez, la actividad peroxidásica disminuye, tanto en el zumo como en las partes sólidas. El contenido en enzima varia según el género de cepa y, para una misma variedad de cepa, la actividad peroxidásica parece ser más importante para las uvas negras que para las uvas blancas.

En el zumo neutralizado y adicionado de polivinilpirrolidona, resulta dificil de destruir la peroxidasa. Esta resiste bien al calor, a los inhibidores, al anhidrido sulfuroso y a la bentonita.

En el zumo natural, en medio ácido, la peroxidasa es más sensible a la acción de los inhibidores. El anhidrido sulfuroso llega a inhibirla rápidamente, sin que la inactivación llegue a ser total. La bentonita reduce su actividad de forma apreciable y el calor provoca una pérdida de actividad rápida e importante, y ello a partir de una temperatura critica según el pH. El calentamiento de la uva representa, consecutivamente, un medio rapido e eficaz de eliminación de la peroxidasa.

RIASSUNTO

LA PEROSSIDASI DELL'UVA. STUDIO DI ALCUNE PROPRIETÀ

Per lo studio di alcune proprietà della perossidasi dell'uva : evoluzione durante la maturazione, variazione secondo i vitigni, localizzazione nelle varie parti del frutto, stabilità dell'enzima nell'uva staccata dal ceppo, è stata impiegata una tecnica d'estrazione e di valutazione messa a punto dagli autori.

Questo studio ha permesso di constatare che la perossidasi è presente nell'uva sotto forma solubile e passa nel succo quando il chicco viene schiacciato. L'uva ne elabora fino alla sua piena maturità ; quando essa è sovrammatura, l'attività perossidasica diminuisce sia nel succo che nelle parti solide. Il tenore di enzima varia con il vitigno ; per uno stresso vitigno, l'attività perossidasica sembra più rilevante per l'uva rossa che per l'uva bianca.

Nel succo neutralizzato e in cui è stato aggiunto del polivinilpirrolidone, la perossidasi è difficile da distruggere. Essa resiste bene al calore, agli inhibitori, all'anidride solforosa e alla bentonite.

Nel succo naturale, in mezzo acido, la perossidasi è più sensibile all'azione degli inhibitori. L'anidride solforosa l'inibisce rapidamente senza che l'inattivazione sia totale, la bentonite riduce sensibilmente la sua attività, il calore determina una rapida ed elevata perdita d'attività a partire da una temperatura critica variabile secondo il pH. Il riscaldamento dell'uva rappresenta dunque un mezzo rapido ed efficace per eliminare la perossidasi.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Demeaux M., Bidan P., 1967. Étude de l'inactivation par la chaleur de la polyphénoloxydase du jus de raisin. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 75-79.

Dobrolyubskii O. K., 1957. Altération de quelques processus d'oxydo-réduction dans le raisin sous l'influence de traces d'éléments. *Dokl. Akad. Nauk. S. S. S. R.*, 117, 1 064-1 067. (en russe).

Gasanov T. G., 1964. Enzymes oxydatifs et protéolytiques dans les variétés de vignes utilisées pour la production de vins de table. *Uch. Zap. Azeb. Goz. Univ. Ser. Biol. Nauk.*, **2**, 79-91. (en russe).

Guinot Y., Menoret Y., 1965. Le chauffage continu du raisin avant pressurage. *C. R. Acad. Agric. Fr.*, **51**, 866-872.

Hussein A. A., Cruess W. V., 1940. Properties of the oxidising enzymes of certain *vinifera* grapes. *Food Res.*, (5), 637-648.

Ivanov T., Ivanova A., 1968. Sur l'oxydation du moût de raisin. III. Activité de la polyphénoloxydase et de la peroxydase au cours de la maturation du raisin des cépages *Muscat* rouge, *Dimiat, Riesling* et *Aligoté*. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 333-340.

Milisavljevic D., 1963. Prévention des troubles protéiques du vin par l'emploi de bentonite dans le moût. *Ann. Technol. agric.*, n° hors série. Symposium intern. d'Œnologie, 315-327.

Monikowski C., Chmielnicka E., 1964. Le rôle de l'acide sulfureux dans le processus d'oxydation peroxydasique de l'acide L-ascorbique en présence de H_2O_2. *Rev. Ferment. Ind. alim.*, **19**, 113-120.

Morkovich M. S., Rikhter A. G., 1964. Activité enzymatique de raisins de Moldavie. *Tr. Mold. Nauchn. Issled Inst. Pishch. Pram.*, **5**, 71-74. (en russe).

Pointing J. D., 1960. The control of enzymatic browning of fruits. In Schultz H. W., *Food enzymes*, 105-124. Avi publishing Co, Westport.

Poux C., 1965. Le produit de base : le raisin mûr. *Bull. techn. Inform.*, (196), 49-54.

Poux C., Ournac A., 1972. Détermination de la peroxydase dans le raisin. *Ann. Technol. agric.*, **21** (1), 47-67.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 39-50.

ÉTUDE DE LA VARIATION DE LA DURETÉ DU FRUIT *IN SITU* CHEZ LE PÊCHER (1)

R. MONET, Y. BASTARD et Bernadette CAMPOY

Station d'Arboriculture fruitière,
Centre de Recherches de Bordeaux, I. N. R. A.,
33140 Pont de la Maye

RÉSUMÉ

Des mesures régulières de la dureté, réalisées avec un pénétromètre miniaturisé sur des pêches en cours de croissance, ont montré que la variation de cette caractéristique se décompose en trois phases.

Une phase pendant laquelle la dureté croît. Elle coïncide avec la période où l'augmentation de la taille du jeune fruit se fait surtout par des divisions cellulaires.

Une phase pendant laquelle la dureté décroît lentement. Elle coïncide avec la période d'augmentation de la taille du fruit par l'élongation radiale de ses cellules.

Une phase au cours de laquelle la dureté décroît rapidement. Elle a lieu à la fin de la croissance du fruit et pourrait être due à l'hydrolyse des parois cellulaires.

D'un point de vue pratique, on a pu, pour certaines variétés, fixer une dureté correspondant à l'époque optimale de récolte.

Mots clés : *pêcher, maturité, dureté.*

INTRODUCTION

L'état de maturité d'un fruit au moment de sa cueillette conditionne son évolution ultérieure et a, de ce fait, une influence considérable sur sa qualité.

L'appréciation de l'état de maturité est importante ; elle a fait l'objet de plusieurs recherches visant à mieux connaître l'évolution du fruit et à prévoir par des tests appropriés la date optimale de la récolte.

La mesure de la dureté du fruit à l'aide d'un pénétromètre est sans doute le

(1) Ce travail a été réalisé grâce à une subvention de la D. G. R. S. T. (contrat nº 72.7.0245).

plus utilisé de ces tests. Il pose cependant quelques problèmes : l'échantillonnage est difficile, le pénétromètre provoque une blessure qui entraîne la perte du fruit.

Blake *et al.* (1931) ont réalisé une étude très complète sur la variation de la dureté des pêches ; du fait des difficultés que nous venons d'invoquer sur l'emploi des pénétromètres, ils n'ont établi qu'une courbe de variation de la dureté moyenne d'échantillons de pêches cueillies périodiquement et sacrifiées pour la mesure. Ainsi leur étude ne donne qu'un reflet imparfait de ce qu'il advient de la dureté d'un fruit pendant sa croissance et sa maturation sur l'arbre.

Nous avons pensé que s'il était possible de mesurer régulièrement la dureté d'une même pêche restée sur l'arbre en utilisant un pénétromètre miniaturisé, qui ne provoque sur celle-ci qu'une blessure suffisamment faible pour ne pas en modifier la physiologie ni en entraîner la chute, nous aurions des informations précises sur l'évolution de ce caractère et la possibilité de l'analyser plus en détail.

La réalisation et l'étalonnage d'un pénétromètre miniaturisé, peu encombrant, pourraient contribuer aussi à la vulgarisation du test.

Nous donnons ci-dessous les résultats de ce travail.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Une partie de notre étude s'est déroulée sur des arbres maintenus en serre, l'autre partie sur des arbres de collection à l'extérieur.

Pour ce qui est des arbres maintenus en serre, nous disposions de deux variétés : une variété de nectarines, *Morton*, et une variété de pêches blanches tardives, *Michelini*. Ces arbres, élevés en pots pendant deux ans à l'extérieur, ont été rentrés en serre au mois de février. Après leur floraison, dès que les fruits ont été noués, nous avons étiqueté deux d'entre eux sur le même rameau mixte d'un arbre de la variété *Morton* et trois autres sur un même rameau mixte d'un arbre de la variété *Michelini*. Ce sont ces fruits qui ont été soumis aux mesures de dureté.

En collection à l'extérieur, nous avons travaillé sur deux autres variétés : une variété de pêches à chair blanche, *Redwing*, une variété de pêches à chair jaune, *Redhaven* ; ces arbres étaient âgés de 9 ans.

L'étude réalisée à l'extérieur était plus complexe que celle réalisée en serre. En effet, l'objectif à atteindre était non seulement de voir si l'on retrouvait dans des conditions normales de culture les résultats déjà observés en serre, mais aussi nous nous proposions de chercher la dureté optimale que devaient avoir les fruits au moment de la cueillette pour qu'ils aient la plus longue durée de conservation, tout en possédant une qualité gustative acceptable au moment de leur consommation.

Nous avons, pour chaque variété, étiqueté quarante fruits, pris au hasard dans toute la frondaison de l'arbre. Ces fruits ont été soumis trois fois par semaine aux mesures de dureté. Peu avant maturité, on devait prélever parmi eux à intervalles réguliers des échantillons de cinq fruits ayant la même dureté.

L'échantillon cueilli était placé au laboratoire pour qu'il finisse sa maturation, il était dégusté ensuite.

Connaissant la dureté des fruits de l'échantillon au moment de la cueillette, et ce que devenait la qualité gustative pendant le complément de maturation au laboratoire, il devait être possible de trouver la dureté optimale des fruits à la cueillette compatible avec une bonne conservation.

Le pénétromètre que nous avons construit spécialement pour cette étude avait un embout de section circulaire de 1 millimètre de diamètre. La relation entre la longueur d'écrasement du ressort x exprimée en millimètres et la force y exprimée en grammes nécessaire pour produire cet écrasement est la suivante :

$$y = 38\,x + 150.$$

Nous ne parlerons dans cette étude que des valeurs x données directement par le pénétromètre (unités de dureté).

Les mesures de dureté ont été réalisées de la manière suivante : la joue du fruit sur laquelle la mesure allait être faite était désinfectée à l'éther éthylique, l'embout du pénétromètre était lui

aussi désinfecté, puis une seule piqûre était pratiquée en tenant le pénétromètre d'une main, l'autre main maintenant le fruit pour qu'il ne se détache pas de son rameau. L'opération était périodiquement renouvelée sur le même fruit au cours de sa croissance en veillant à ce que les piqûres restent localisées à l'intérieur d'un cercle de 3 cm de diamètre.

Chaque point de nos courbes ne correspond ainsi qu'à une mesure de dureté et non à une moyenne de mesures ; nous examinerons dans la discussion la validité des graphiques obtenus de cette manière.

Enfin, pour comprendre les phénomènes qui déterminent les variations et la dureté des fruits, nous avons simultanément mesuré leur croissance.

Nos courbes de croissance concernent la distance entre les deux joues du fruit mesurée au pied à coulisse.

RÉSULTATS

A. — *Mesures en serre*

Les mesures effectuées en serre se sont déroulées d'une manière très satisfaisante ; nous n'avons pas eu, comme à l'extérieur, des pourritures dues au *Monilia*.

Les piqûres provoquées par le pénétromètre n'ont pas modifié l'évolution des fruits qui ont mûri sensiblement à la même époque que les autres fruits de l'arbre et ont atteint une taille comparable.

Tout au plus avons-nous constaté un faible aplatissement de la zone au niveau des piqûres, et la formation d'un peu de gomme dans le creux des blessures.

1. *Fruits de la variété* Morton.

Les deux fruits qui ont été soumis aux mesures ont eu un développement analogue. Leur courbe de croissance est sensiblement la même. Ils ont mûri en même temps, leur taille à la récolte était très voisine.

On observe que les courbes retraçant l'évolution de la dureté du fruit (que nous avons à dessein confrontées avec les courbes de croissance) ont une allure générale assez voisine (fig. 1) ; elles se décomposent en trois phases.

Une phase de dureté croissante qui atteint son maximum à la fin du premier palier de croissance du fruit (4 mai).

Une phase pendant laquelle la dureté du fruit décroît lentement (du 4 mai au 28 mai). Elle commence à la fin du premier palier de croissance du fruit et cesse au début du second palier. Cette phase est donc associée à la période de croissance la plus active du fruit.

Une phase où la dureté du fruit décroît très rapidement. Elle commence lorsque le fruit a atteint sa dimension définitive (après le 28 mai).

2. *Fruits de la variété* Michelini.

Cette variété, normalement très tardive, a donné en serre des fruits petits et peu colorés. Nous avons choisi sur elle trois fruits portés par le même rameau. Ils ont été tous les trois soumis aux mesures de croissance et de dureté.

Le comportement des trois fruits est encore très voisin ; leur croissance est parallèle, le fruit du sommet du rameau sera à maturité le plus gros, celui du milieu intermédiaire, celui de la base sera le plus petit (fig. 2). Ces courbes de croissance ont cependant vis-à-vis de celles des fruits de la nectarine *Morton* une pente moins forte, la croissance se poursuit aussi sur une période plus longue.

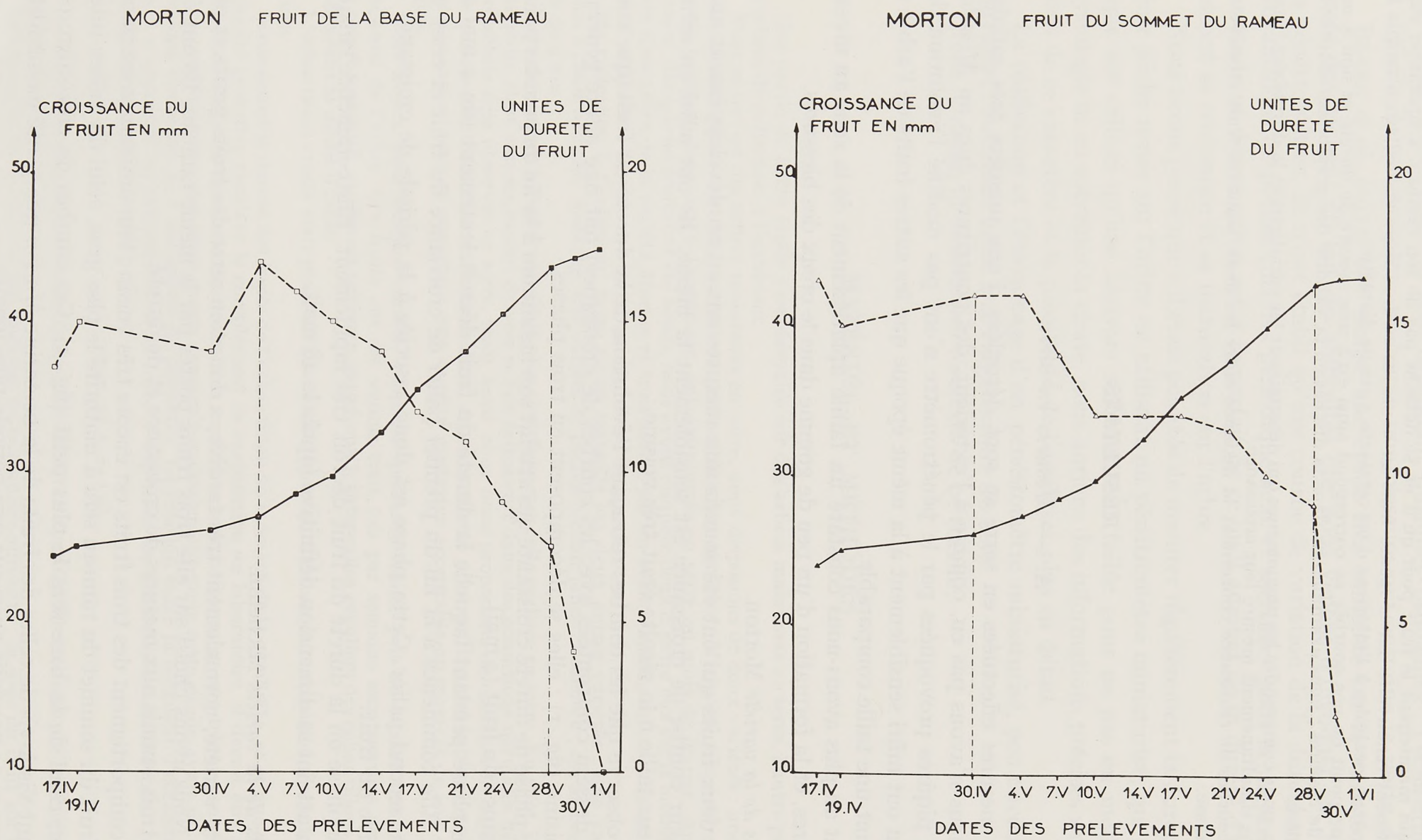


FIG. 1 — A gauche, *en trait plein, courbe retraçant la croissance du fruit de la base du rameau de la variété* Morton ; *en tirets, courbe retraçant la variation de la dureté du même fruit.* A droite, *on a représenté de la même façon la courbe de croissance et celle de la dureté du fruit du sommet du rameau*

On retrouve dans les courbes de l'évolution de la dureté de ces fruits les trois phases que nous avons délimitées chez *Morton* avec peut-être quelques anomalies dans la deuxième phase (mesures situées aux environs du 27 juin).

D'une manière générale, ces fruits ont une dureté supérieure à celle des fruits de la nectarine, mais cette dureté a une décroissance plus brutale pendant la troisième phase.

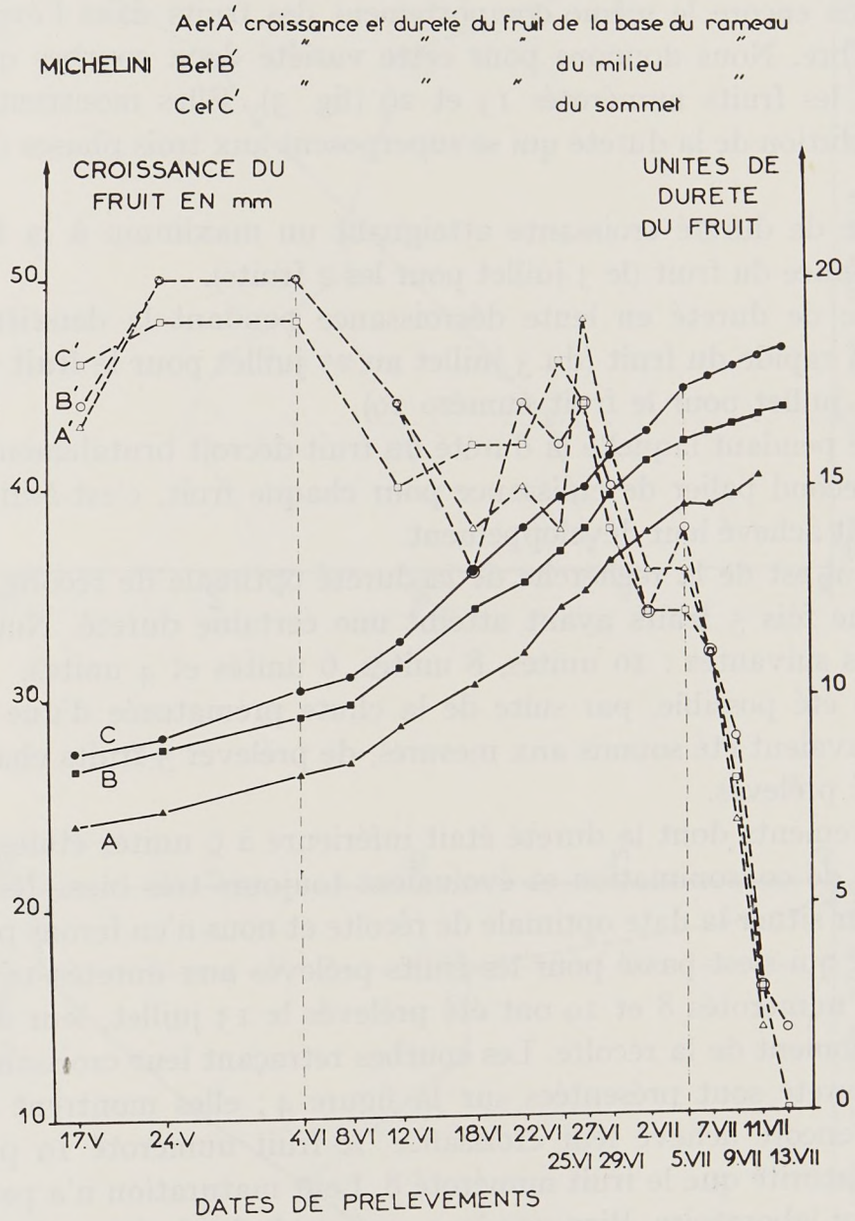


FIG. 2. — *Sur ce graphique figurent les courbes de croissance A-B-C et les courbes de dureté A'-B'-C' des trois fruits de la variété* Michelini. La lettre A est affectée au fruit de la base du rameau, la lettre B au fruit du milieu, la lettre C au fruit du sommet du rameau.

B. — *Mesures à l'extérieur sur des arbres de collection*

Il n'a pas été possible d'obtenir des courbes de croissance et de dureté complètes pour tous les fruits qui avaient été étiquetés (40 pour chaque variété). En effet, en dépit de la désinfection à l'éther éthylique du point de pénétration de l'appareil au moment de la mesure de la dureté, nous n'avons pu éviter les pourritures consécutives à une infection par le *Monilia*. Nous ne possédons donc des graphiques complets que pour très peu de fruits, les autres ayant chuté avant maturité n'ont pu nous laisser que des informations partielles.

La réalisation des mesures a été elle aussi moins aisée (fruits difficiles à atteindre, conditions météorologiques défavorables) ; on peut penser que les erreurs commises à l'extérieur ont été plus importantes que celles de serre.

1. *Fruits de la variété* Redwing.

Quelles qu'auraient pu être les imperfections de ce travail fait à l'extérieur, nous retrouvons encore le même comportement des fruits dans l'évolution de leur dureté sur l'arbre. Nous donnons pour cette variété deux courbes qui ont pu être achevées pour les fruits numérotés 13 et 29 (fig. 3). Elles montrent bien les trois phases de l'évolution de la dureté qui se superposent aux trois phases de la croissance du fruit.

Une phase de dureté croissante atteignant un maximum à la fin du premier palier de croissance du fruit (le 3 juillet pour les 2 fruits).

Une phase de dureté en lente décroissance pendant la deuxième période de développement rapide du fruit (du 3 juillet au 27 juillet pour le fruit numéro 13, du 3 juillet au 20 juillet pour le fruit numéro 29).

Une phase pendant laquelle la dureté du fruit décroît brutalement ; elle se situe au début du second palier de croissance pour chaque fruit, c'est-à-dire au moment où ces fruits ont achevé leur développement.

Pour ce qui est de la recherche de la dureté optimale de récolte, nous devions prélever chaque fois 5 fruits ayant atteint une certaine dureté. Nous nous étions fixé les duretés suivantes : 10 unités, 8 unités, 6 unités et 4 unités.

Il n'a pas été possible, par suite de la chute prématurée d'une grande partie des fruits qui avaient été soumis aux mesures, de prélever 5 fruits chaque fois, seuls 2 fruits ont été prélevés.

Les prélèvements dont la dureté était inférieure à 6 unités étaient très proches de la maturité de consommation et évoluaient toujours très bien. Ils ne nous intéressent pas pour situer la date optimale de récolte et nous n'en ferons pas état.

Voyons ce qui s'est passé pour les fruits prélevés aux duretés 10 et 8.

Les fruits numérotés 8 et 19 ont été prélevés le 13 juillet, leur dureté était de 10 unités au moment de la récolte. Les courbes retraçant leur croissance et la variation de leur dureté sont présentées sur la figure 4 ; elles montrent que ces fruits n'avaient pas encore achevé leur croissance, le fruit numéroté 19 paraissant plus proche de la maturité que le fruit numéroté 8. Leur maturation n'a pas pu s'achever correctement au laboratoire. Bien que leur couleur de fond ait partiellement viré au jaune et que leur chair se soit ramollie, ils présentaient, quatre jours après la cueillette, un épiderme flétri ; leur qualité gustative a été très mauvaise.

Les fruits numérotés 3 et 9 ont été cueillis le 23 juillet, leur dureté était ce jour-là de 8 unités. On voit sur la figure 4 que ces deux fruits étaient sur le point de terminer leur croissance.

Placés au laboratoire, leur évolution a été satisfaisante, la couleur de fond a viré au jaune, ils n'ont pas flétri, leur qualité gustative était bonne.

En se basant sur ces deux prélèvements, il est déjà possible de dire que les fruits de la variété *Redwing* cueillis avec une dureté supérieure ou égale à 10 unités ne sont pas aptes à mûrir correctement. La valeur optimale de récolte doit se situer entre 8 et 10 unités de notre pénétromètre.

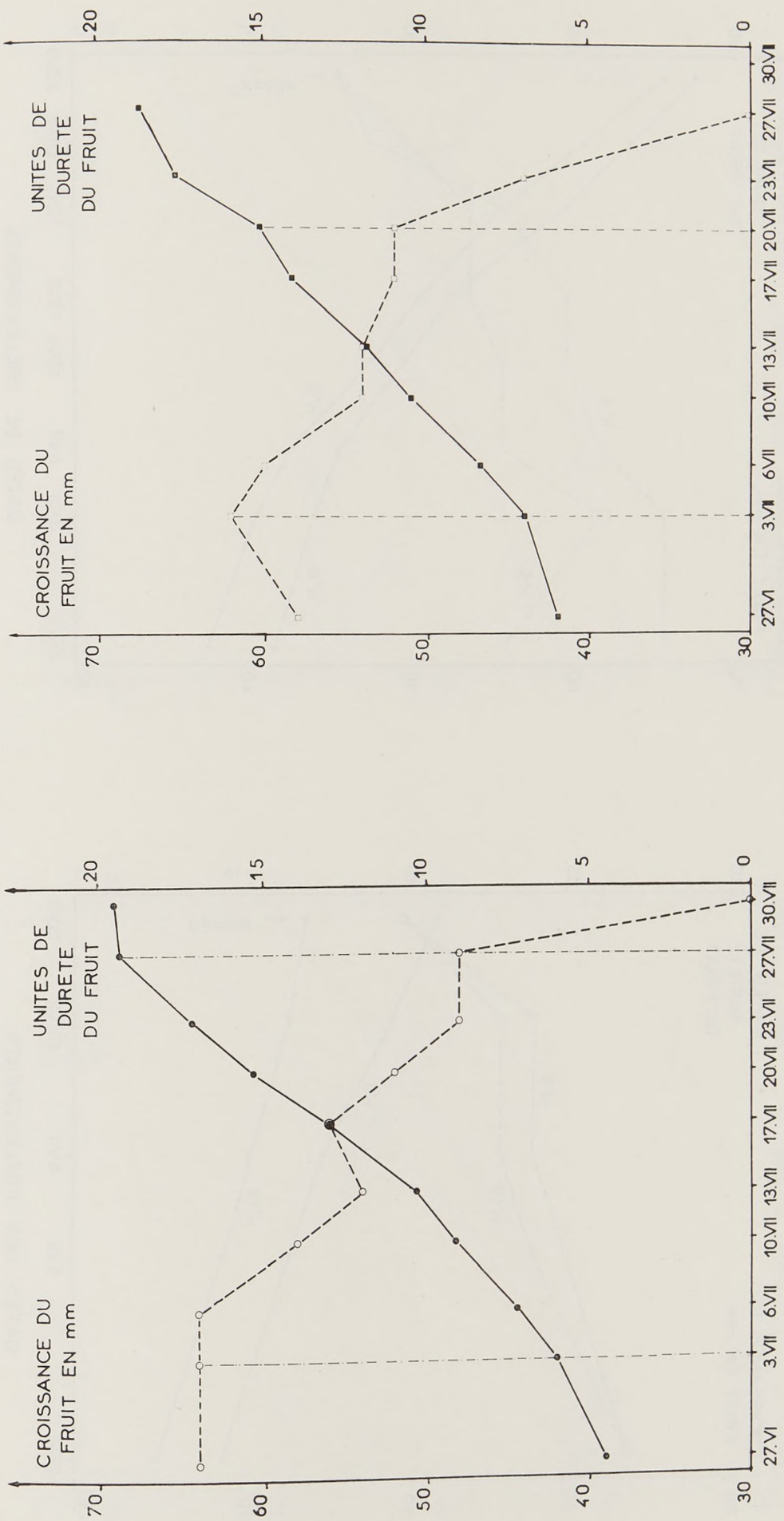


FIG. 3. — A gauche, *en trait plein, courbe de croissance du fruit numéro 13 de la variété* Redwing ; *en tirets, courbe de variation de la dureté du même fruit.*

A droite, *on a représenté de la même manière la courbe de croissance et de dureté du fruit numéro 29*

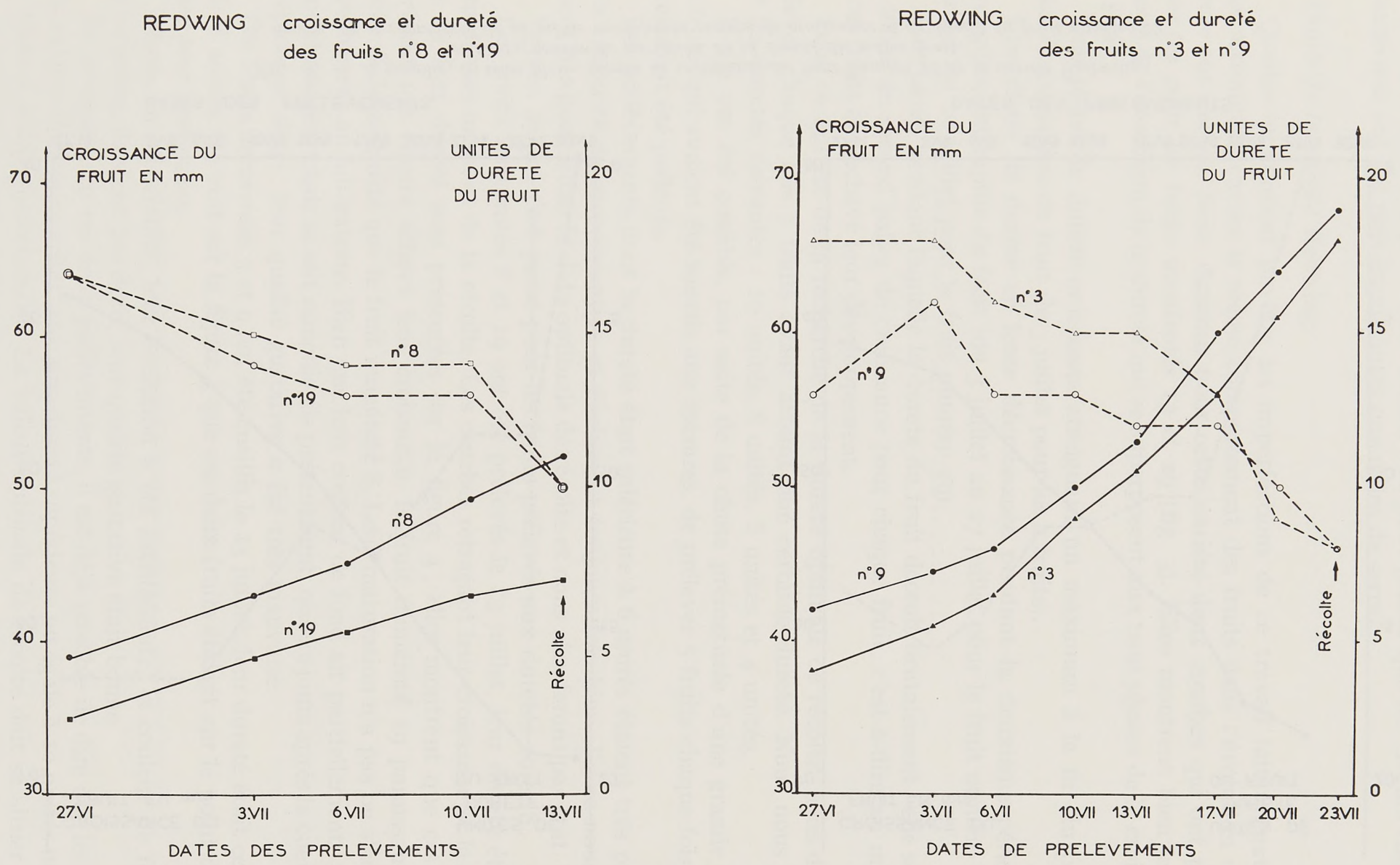


FIG. 4. — A gauche, *courbes de croissance* (trait plein) *et courbes de dureté* (tirets) *des fruits numérotés 8 et 19 de la variété* Redwing, *récoltés le 13 juillet.* A droite, *représentés selon les mêmes conventions, les courbes de croissance et de dureté des fruits numérotés 3 et 9 récoltés le 23 juillet*

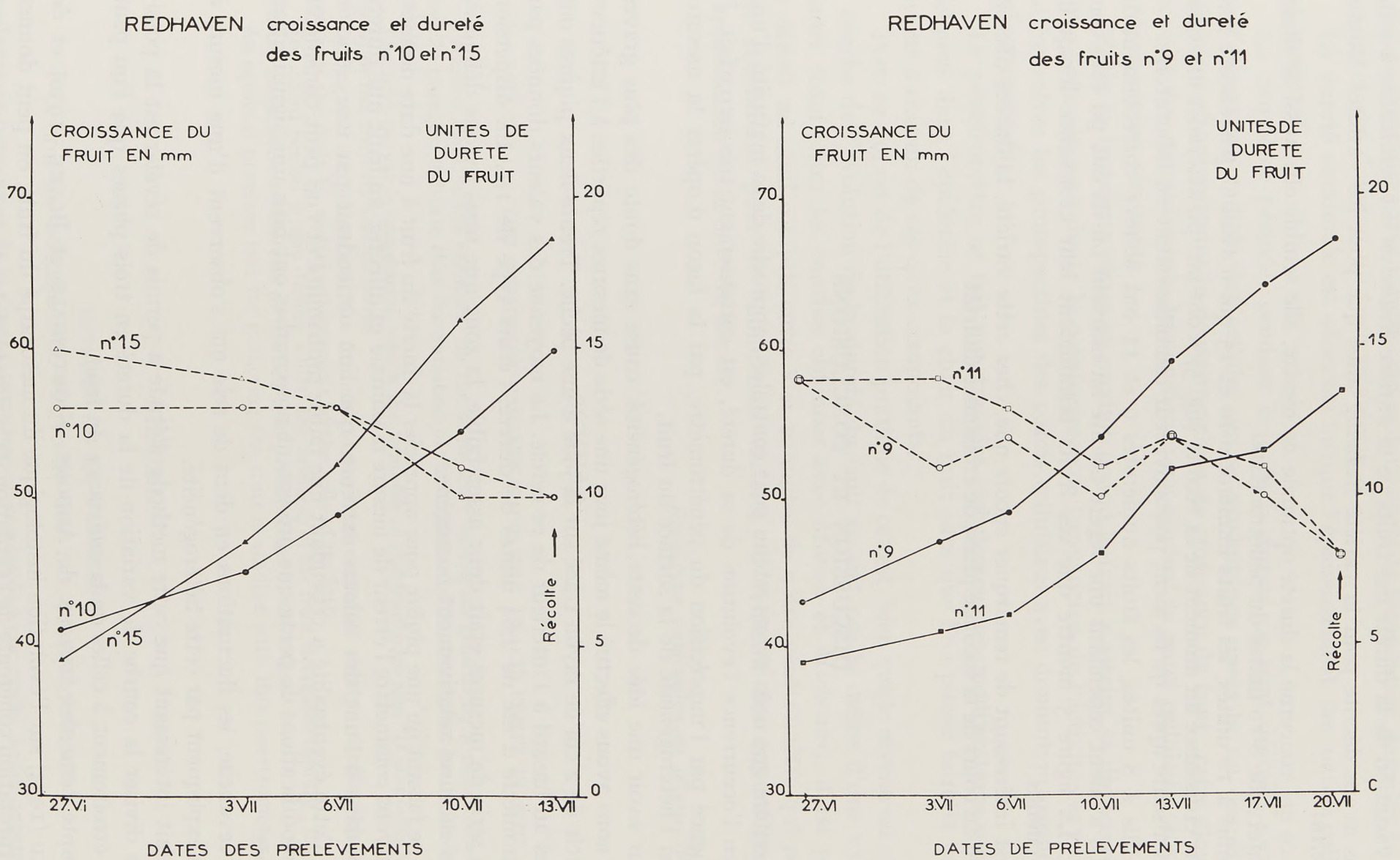


FIG. 5. — A gauche, *courbes de croissance* (traits pleins) *et courbes de duretés* (tirets) *des fruits numérotés 10 et 15 de la variété* Redhaven *récoltés le 13 juillet.* A droite, *représentées de la même manière, les courbes de croissance et de dureté des fruits numérotés 9 et 11 récoltés le 20 juillet.*

2. *Fruits de la variété* Redhaven.

La variation de la dureté des fruits de la variété *Redhaven* est semblable à celle que nous avons décrite pour la variété *Redwing* ainsi que pour les variétés *Morton* et *Michelini*.

En ce qui concerne la dureté optimale de récolte, elle semble elle aussi se situer dans l'intervalle 8-10 unités du pénétromètre.

Cueillis à 10 unités, les fruits numérotés 10 et 15 qui n'avaient pas encore terminé leur croissance au moment de la récolte (fig. 5) n'ont pas pu atteindre une qualité satisfaisante après qu'ils aient poursuivi leur ramollissement au laboratoire.

Cueillis à 8 unités, les fruits numérotés 9 et 11 ont achevé correctement de mûrir. Ils avaient cependant une légère acidité au moment où ils ont pu être consommés. La figure 5 montre que ces fruits terminaient leur croissance lorsqu'ils ont été cueillis.

Il est intéressant de remarquer encore que, chez cette variété, la dureté décroît assez peu au cours de la seconde phase de croissance du fruit.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Le critère que nous avons retenu pour contrôler l'approche de la maturité d'une pêche, en l'occurrence l'évolution de sa dureté, est certainement très imparfait. Il est influencé par l'imprécision du pénétromètre, par la façon d'opérer la mesure, enfin par l'hétérogénéité de la surface du fruit.

Pour avoir une idée de cette hétérogénéité, cause sans doute des plus graves erreurs, nous avons effectué le même jour une série de mesures réparties à l'intérieur d'un cercle de 2 cm de rayon tracé sur la joue d'une pêche. Trente-deux piqûres ont été faites au hasard à l'intérieur de ce cercle. La moyenne des valeurs données par le pénétromètre a été de 2,84 unités de dureté, l'écart type de 1,1. La dispersion de cette série de mesures était donc assez faible, la zone que nous avions délimitée pour nos mesures relativement homogène.

En ne faisant qu'une piqûre pour apprécier la dureté du fruit à une date donnée, nous pouvons commettre l'erreur de mesure maximale et affecter au fruit une dureté correspondant à l'une des valeurs extrêmes que l'on obtiendrait par une série de piqûres. Cette éventualité a cependant une faible probabilité et l'on peut considérer que les modifications de pente que présentent nos courbes ont bien une signification biologique.

En revanche, les fluctuations en dent de scie qui s'observent d'une mesure à l'autre s'expliquent par cette hétérogénéité.

Le fait intéressant que cette méthode d'étude a permis de révéler est la possibilité de diviser la courbe de variation de la dureté en trois phases que l'on peut associer étroitement à celles de la croissance du fruit.

Compte tenu des travaux de Addoms, Nightingale et Blake (1930) et de Ragland (1934) sur l'évolution histologique du mésocarpe du fruit, on peut donner une interprétation cohérente de l'évolution de la dureté et des phases qui apparaissent dans cette évolution.

Ainsi la phase qui correspond à l'élévation de la dureté peut être associée aux divisions cellulaires très rapides qui se font après la fécondation dans les parois de l'ovaire et qui donnent un tissu très dense.

La dureté maximale est observée lorsque l'épaississement des parois cellulaires est maximal.

La deuxième période, pendant laquelle la dureté du fruit décroît, s'explique par l'élongation radiale des cellules qui se produit peu après la fin des divisions cellulaires et qui entraîne la deuxième phase de croissance du fruit ; cette élongation nécessite des remaniements biochimiques qui rendent la paroi cellulaire plus mince et donc moins résistante.

Enfin la troisième phase se produit quand le fruit a atteint sa dimension définitive ; elle est sans doute la conséquence de l'apparition de l'activité enzymatique qui hydrolyse les protopectines des parois cellulaires avec diminution considérable de leur épaisseur.

Le pénétromètre ne fait que traduire globalement les modifications qui interviennent dans l'épiderme et la chair du fruit sans que l'on puisse faire la part qui revient à chacun de ces deux composants.

Pour ce qui est de l'utilisation pratique de ce test, bien que le niveau où s'établit la courbe de l'évolution de la dureté du fruit ne soit pas le même d'une variété à l'autre (confronter les courbes obtenues avec *Morton* et *Michelini*), il est possible de définir un seuil compris entre 8 et 10 unités de notre pénétromètre qui pourrait être satisfaisant pour de nombreuses variétés ; il éviterait des erreurs grossières d'appréciation de la date de récolte.

Reçu pour publication en février 1974.

SUMMARY

STUDY ON THE FIRMNESS VARIATION OF THE PEACH FRUIT *IN SITU*

Pressure tests, made regularly on the same fruit during its growth by a penetrometer with a needle plunger, indicate that the variation of the firmness of the fruit must be divided in three periods.

The first period is one during which the firmness of the fruit increases. It coincides with the growth of the fruit by cell divisions.

During the second period, the firmness of the fruit decreases slowly ; it coincides with the growth of the fruit by radial enlargement of the cells of its flesh.

The third period is one during which the firmness of the fruit decreases rapidly ; it coincides with the enzymatic hydrolysis of the cell wall protopectins of the fruit.

An optimal pressure test for gathering the fruit is studied with this penetrometer.

RESUMEN

ESTUDIO DE LA VARIACION DE LA DUREZA DEL FRUTO *IN SITU* DEL MELOCOTONERO

Diversas mediciones de la dureza, tomadas con regularidad por medio de un penetrómetro miniaturizado, en melocotones durante el transcurso del crecimiento, han permitido demostrar que la variación de esta características se desglosa en tres etapas :

Una etapa durante la cual la dureza aumenta. Esta etapa coincide con el periodo en que aumenta también la dimensión del fruto, sobre todo, por divisiones celulares.

Una etapa durante la cual disminuye lentamente la dureza, coincidiendo con el periodo de aumento de las dimensiones del fruto por elongación radial de sus células.

Una etapa durante la cual la dureza disminuye rápidamente, fenómeno que se produce al final del crecimiento del fruto y que parece derivarse de la hidrólisis de las paredes celulares.

Desde el punto de vista práctico, ha sido posible fijar, para ciertas variedades, una dureza que corresponde a la época óptima de la cosecha.

RIASSUNTO

STUDIO DELLA VARIAZIONE DELLA DUREZZA DEL FRUTTO DEL PESCO *IN SITU*

Delle misure regolari di durezza, rilevate con un penetrometro in miniature su delle pesche durante il loro sviluppo, hanno mostrato che la variazione di questa caratteristica avviene secondo tre fasi.

Una fase durante la quale la durezza aumenta. Essa coincide con il periodo in cui l'aumento della taglia del frutto giovane avviene soprattutto per divisione cellulare.

Una fase durante la quale la durezza diminuisce lentamente. Essa coincide con il periodo in cui l'aumento della taglia del frutto avviene per allungamento radiale delle sue cellule.

Una fase durante la quale la durezza diminuisce rapidamente. Essa si produce alla fine della crescita del frutto e potrebbe essere dovuta all'idrolisi delle pareti cellulari.

Da un punto di vista pratico, per alcune varietà, è stato possibile fissare una durezza corrispondente all' epoca migliore per la raccolta.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Addoms R. M., Nightingale G. T., Blake M. A., 1930. Development and ripening of peaches as correlated with physical characteristics, chemical composition and histological structure of the fruit flesh. II. Histology and micro-chemistry. *Exp. Sta. Bull.*, (507), 1-19. New Brunswick, New Jersey, U. S. A.

Blake M. A., Davidson O. W., Addoms R. M., Nightingale G. T., 1931. Development and ripening of peaches as correlated with physical characteristics, chemical composition and histological structure of the fruit flesh. I. Physical measurement of growth and flesh texture in relation to the market and edibles qualities of the fruit. *Exp. Sta. Bull.*, (525), 1-16, New Brunswick, New Jersey, U. S. A.

Ragland C. H., 1934. The development of the peach fruit, with special reference to split pit and gumming. *Proc. am. Soc. Hortic. Sci.*, **31**, 1-21.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 51-63.

STRUCTURE SUBMICROSCOPIQUE DES FRACTIONS PROTÉIQUES DU GLUTEN DE BLÉ SOUMISES A L'ACTION DE DIFFÉRENTES ENZYMES PROTÉOLYTIQUES (1)

Nicole CROZET, Alice de PASTORS et L. PETIT

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales,
C. E. R. D. I. A., I. N. R. A.,
91305 Massy

RÉSUMÉ

Les modifications de structure du gluten et de ses deux principales fractions, la gliadine et la gluténine, soumis à l'action de différentes protéases, sont observées par microscopie électronique ; ont été utilisées une protéase d'origine fongique préparée industriellement et deux enzymes plus spécifiques : la trypsine et la pepsine.

La protéase fongique entraîne une dégradation par formation de trous dans la masse protéique ; dans la gliadine elle fait apparaître, en outre, des arrangements lamellaires comparables à certaines structures lipoprotéiques observées dans des substrats variés par différents auteurs. Les modifications ultrastructurales du gluten ont été examinées en fonction du temps de protéolyse.

Si, dans l'ensemble, la trypsine provoque des altérations semblables à celles données par la protéase industrielle, la pepsine modifie de façon différente la structure des protéines qui prennent l'aspect de petits amas formés par des assemblages fibrillaires.

Mots clés : *blé, gluten, protéines, enzymes protéolytiques.*

INTRODUCTION

Certains composants protéiques et lipoprotéiques du gluten de blé présentent en coupe des structures submicroscopiques caractéristiques. SIMMONDS (1973) a observé dans une fraction du gluten insoluble dans l'urée des résidus membranaires

(1) Une partie de ce travail a fait l'objet d'un exposé au Symposium « Seed Proteins » de l'American Chemical Society (Los Angeles, mars 1971).
Une partie de ce travail a été effectuée à l'occasion du contrat D. G. R. S. T. n° 68 01 135.

et du reticulum endoplasmique dégradés ainsi que des structures vésiculaires. Lors d'une étude antérieure par microscopie électronique (CROZET *et al.*), nous avons trouvé que la gliadine est lisse et compacte, alors que la gluténine apparaît hétérogène, avec des zones fibrillaires et granulaires, le gluten total étant constitué par la juxtaposition de ces deux types structuraux.

VERMA et MCCALLA (1966), YANG et MCCALLA (1968) et OKA BABEL et DRAUDT (1965) ont montré que les protéases attaquent de façon différente la gliadine et la gluténine. BIETZ et ROTHFUS (1970, 1971) ont, par ailleurs, utilisé l'hydrolyse enzymatique pour étudier, par des méthodes physico-chimiques, la structure des fractions protéiques du gluten.

Le présent travail fait ressortir comment l'observation en microscopie électronique peut préciser les modifications structurales du gluten et de ses constituants protéiques résultant d'hydrolyse enzymatique ; deux enzymes d'intérêt nutritionnel, la trypsine et la pepsine, et une protéase provenant d'une préparation industrielle, ont été utilisées dans ce but.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Fractions protéiques

Le gluten étudié est d'origine industrielle (Roquette). La gliadine et la gluténine sont préparées selon la technique de MILLS (1954) à partir d'un gluten extrait d'une farine commerciale destinée à la panification, caractérisée par son alvéogramme (W = 133, P = 46, G = 23,8). Le gluten fragmenté (110 g) est immergé dans 250 ml d'éthanol à 70 p. 100 et maintenu à 37°C pendant une nuit. Après décantation, une nouvelle extraction est effectuée dans les mêmes conditions. Le culot est lavé à l'alcool à 70 p. 100 et mis à sécher ; il constitue la fraction gluténine. La gliadine est précipitée par addition d'un volume égal d'eau aux surnageants rassemblés. Les produits obtenus sont lyophilisés. Ils sont ensuite redispersés par broyage au mortier dans le tampon, avant d'être soumis à l'action des protéases.

Protéolyse

Les conditions de travail sont définies dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Enzyme	Tampon	Concentrations en		$\frac{\text{Enzyme}}{\text{N Substrat}} \times 10^2$
		enzyme (1) (mg/ml)	N substrat (mg/ml)	
F 286 (Rapidase)	Acétate 0,2 M pH 4	0,16	3,20	5
Trypsine	Phosphate 0,1 M pH 8	0,08	3,20	2,5
Pepsine	HCl pH 1	0,04	3,20	1,25

(1) Ces concentrations ont été choisies de façon à obtenir des taux de protéolyse voisins en 5 heures.

Après incubation à 40°C sous agitation modérée, on centrifuge pour séparer le résidu non digéré. Celui-ci est congelé à — 20°C en attendant d'être traité en vue de son examen au microscope électronique. Le degré de protéolyse est évalué par dosage d'azote dans le digestat.

Mesure du taux de protéolyse

A 25 ml du digestat, on ajoute 5 ml d'une solution d'acide trichloroacétique à 36 p. 100. Après attente de 15 mn, on centrifuge puis on dose l'azote dans le surnageant par la méthode de KJELDAHL. La quantité d'azote ainsi dosée ayant été rapportée au volume total de digestat, on exprime le taux de protéolyse par le rapport de cette grandeur N_d à la quantité d'azote N_t apportée par la prise d'échantillon : (P p. 100 = $N_d/N_t \times 100$).

Microscopie électronique

Les échantillons (matériel témoin ou résidu de protéolyse) sont fixés par une solution de formol à 15 p. 100 dans un tampon acétate-véronal à pH 7, puis post-fixés par une solution de OsO_4 à 1 p. 100 dans le même tampon ; ces conditions sont réputées préserver au mieux les structures protéiques et lipoprotéiques (KAYE et MOSES, 1960). Ils sont ensuite déshydratés par l'éthanol et inclus dans un mélange de méthacrylate de méthyle et de butyle. Les coupes fines sont observées au microscope électronique SIEMENS du type Elmiskop 1.

RÉSULTATS

1. — *Modifications ultrastructurales de la gluténine, de la gliadine et du gluten sous l'action de la protéase fongique ou de la trypsine*

La dégradation de la gluténine (Pl. I) par la protéase fongique semble intervenir au hasard par formation de trous dans l'ensemble de la masse protéique et fragmentation de celle-ci. Sur la figure 2, on peut voir le degré d'altération d'un échantillon de gluténine ayant subi l'action de cette protéase pendant 5 h, correspondant à un taux de protéolyse de 22,5 p. 100, en comparaison avec un échantillon témoin (fig. 1).

En ce qui concerne la gliadine (Pl. II), les modifications de structure observées au cours de l'hydrolyse enzymatique sont beaucoup plus caractéristiques. L'échantillon témoin est lisse et compact (fig. 4). Après 1 h de protéolyse, on remarque (fig. 5), outre la formation de trous dans la masse protéique, l'apparition de structures constituées par des enroulements de fines enveloppes qui semblent prendre naissance à l'intérieur des cavités. Au bout de 5 h, lorsque 24 p. 100 d'azote sont solubilisés (fig. 6 *a*), le réseau protéique devient beaucoup moins compact, et laisse entrevoir une structure réticulée ainsi que des enroulements lamellaires. De plus, on trouve un grand nombre de structures concentriques fines constituées par des filaments espacés régulièrement de 5 nm environ (fig. 6 *b*, Pl. II). Sur ces filaments contrastés par OsO_4, on note parfois la présence de fins dépôts d'osmium. Ces arrangements ressemblent à des figures myéliniques, de nature lipidique ou lipoprotéique, observées en microscopie électronique par différents auteurs et décrites, en particulier, par STOEKENIUS (1959).

Dans le cas du gluten (Pl. III), une étude plus systématique a été entreprise afin de suivre l'évolution des structures protéiques en fonction du temps d'action de la protéase fongique. Après 1 h de protéolyse, on observe (fig. 9) un début de dégradation se traduisant par une fragmentation de la masse accompagnée de l'apparition de trous. Il ne semble pas que l'attaque enzymatique soit sélective ; les zones

PLANCHE I

Gluténine

FIG. 1

Échantillon témoin placé dans un tampon acétate de pH 4 pendant 5 h, à 40°C (× 25 000).

FIG. 2

Hydrolysée par une protéase fongique pendant 5 h (22,5 p. 100 de N solubilisés) montrant une dégradation par formation de trous dans la masse protéique (× 30 000).

FIG. 3

Protéolysée par la trypsine pendant 2 h (19 p. 100 de N solubilisés). Les modifications de structure sont du même type que celles obtenues avec la protéase fongique (× 30 000).

FIG. 13

Hydrolysée par la pepsine pendant 2 h (20 p. 100 de N solubilisés) (× 30 000)

Pl. I

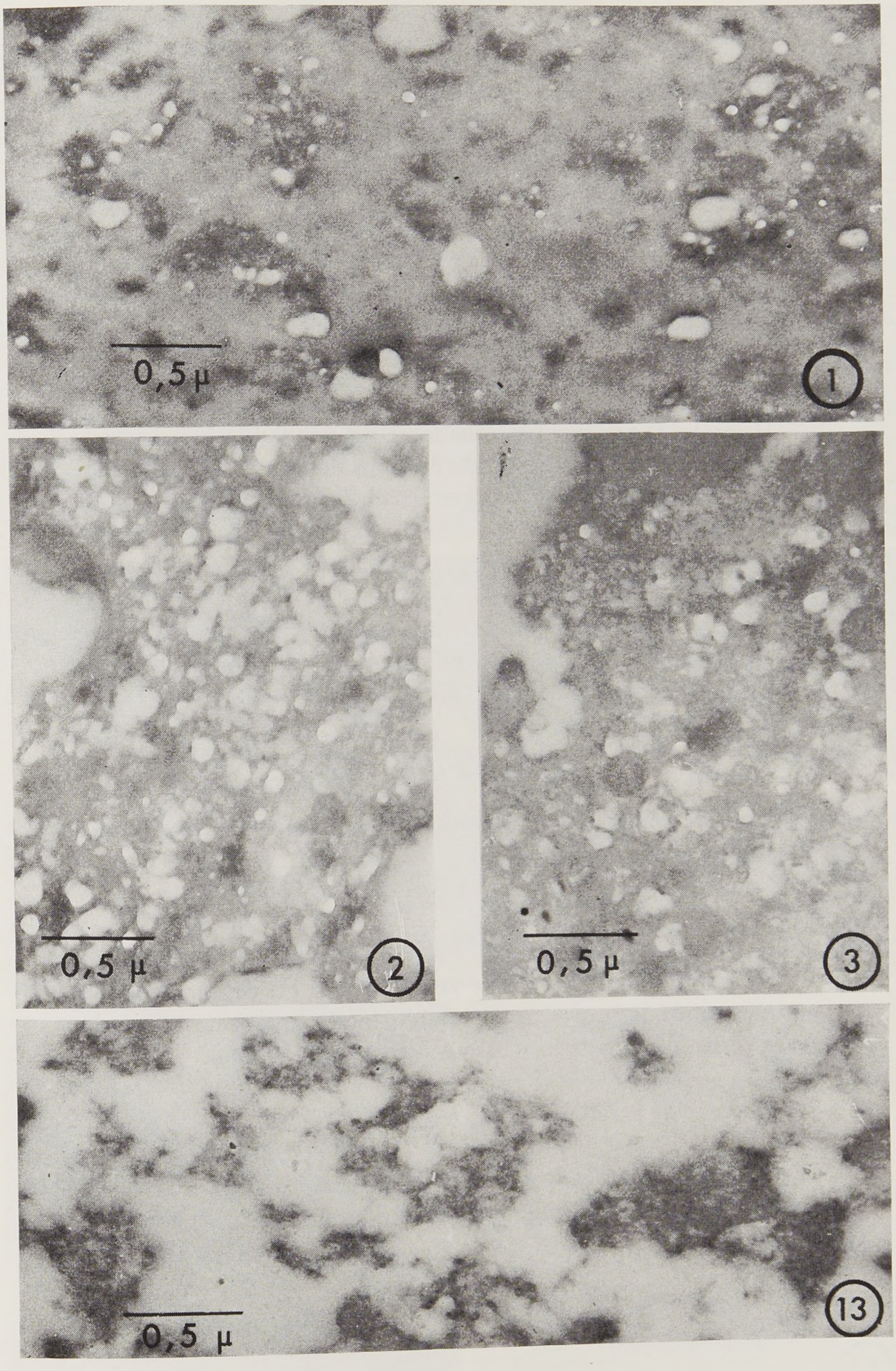


PLANCHE II

Gliadine

FIG. 4

Échantillon témoin placé dans un tampon acétate de pH 4 5 h à 40°C (× 30 000).

FIG. 5

Hydrolysée par une protéase fongique pendant 1 h. La dégradation se traduit par la formation de trous dans la masse protéique et l'apparition de fines enveloppes enroulées (flèches) (× 40 000).

FIG. 6 *a*

Après 5 h de protéolyse par une protéase fongique (24 p. 100 de N solubilisés). On observe des structures (▲) constituées par de fines lamelles concentriques (flèches) (× 40 000).

FIG. 6 *b*

Agrandissement montrant des lamelles concentriques espacées de 5 nm environ (× 160 000).

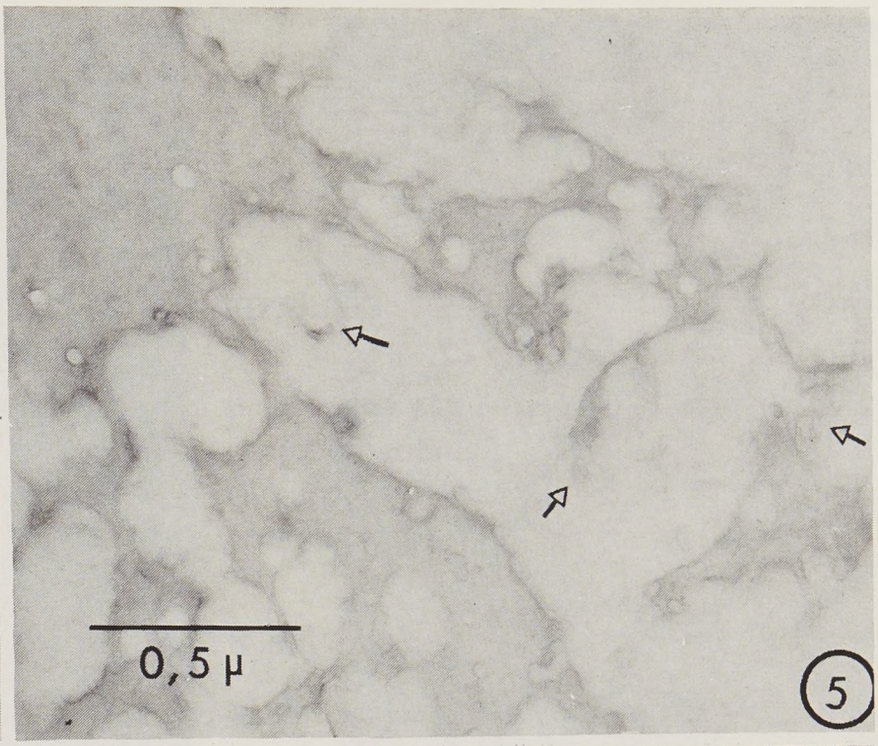
FIG. 7

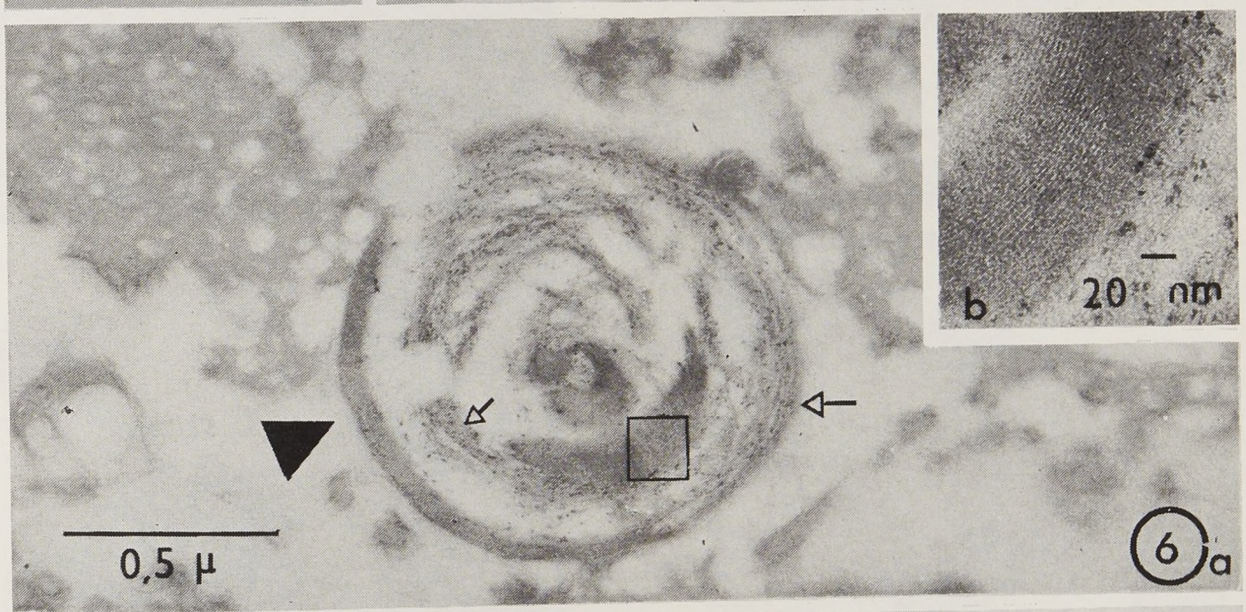
Hydrolysée par la trypsine pendant 2 h. La dégradation est peu importante (5 p. 100 de N solubilisés) et se manifeste par la présence de trous dans la masse protéique (× 30 000).

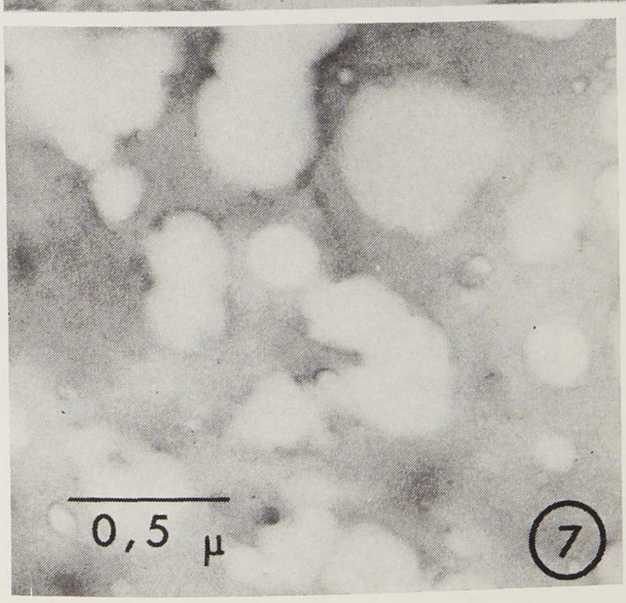
FIG. 12

Hydrolysée par la pepsine pendant 2 h (14,5 p. 100 de N solubilisés) présentant une structure discontinue et fibrillaire (× 30 000).

Pl. II







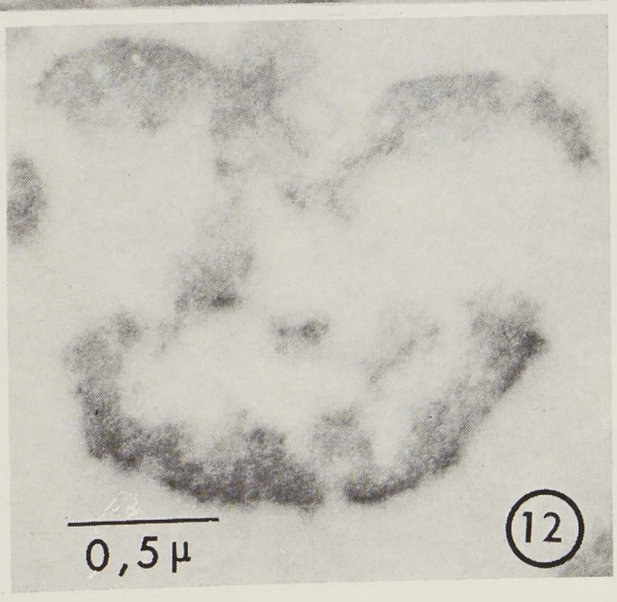


PLANCHE III

Gluten soumis à l'action de la protéase fongique
L : globules lipidiques ;
G : zones de structure type gliadine ;
g : de type gluténine.

FIG. 8

Échantillon témoin placé dans un tampon acétate de pH 4 pendant 5 h à 40°C (× 30 000).

FIG. 9

Après 1 h de protéolyse, on note un début de dégradation par formation de trous dans la masse protéique (× 30 000).

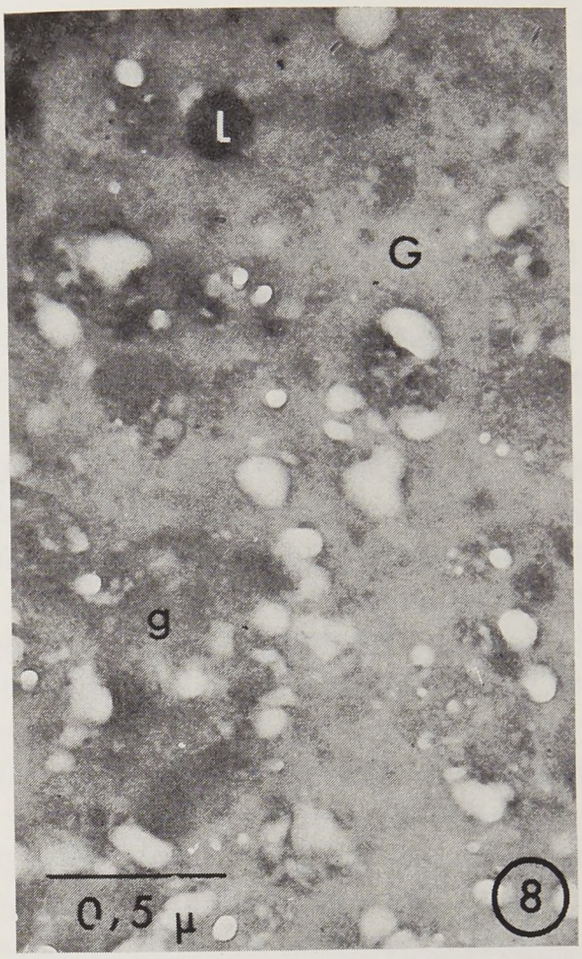
FIG. 10

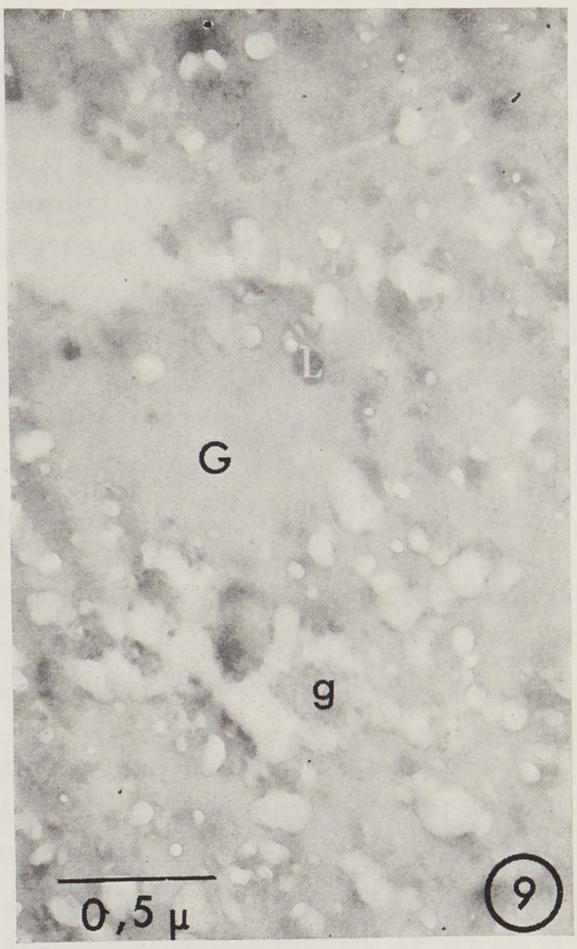
Après 5 h de protéolyse (13 p. 100 de N solubilisés), la structure des protéines est réticulée et peu compacte (× 30 000).

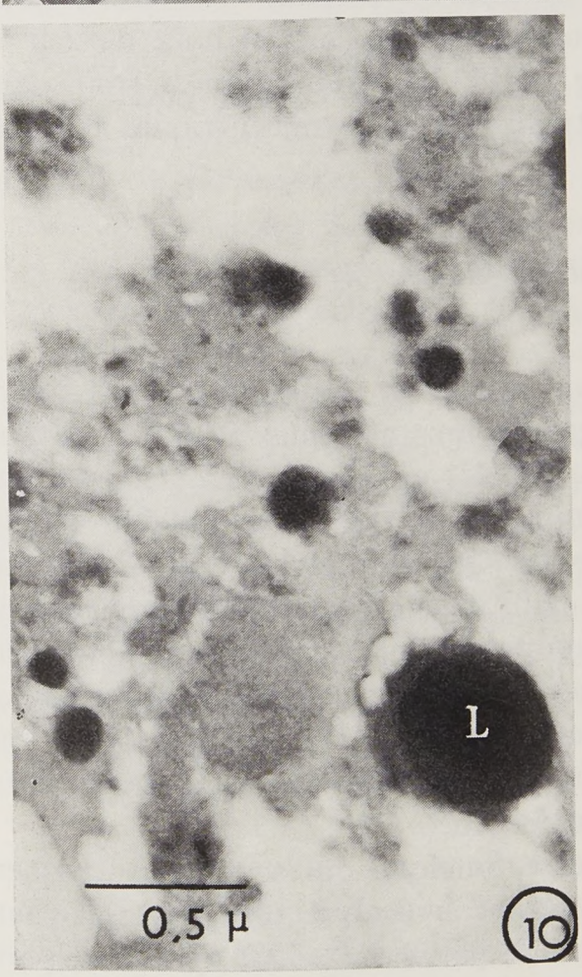
FIG. 11

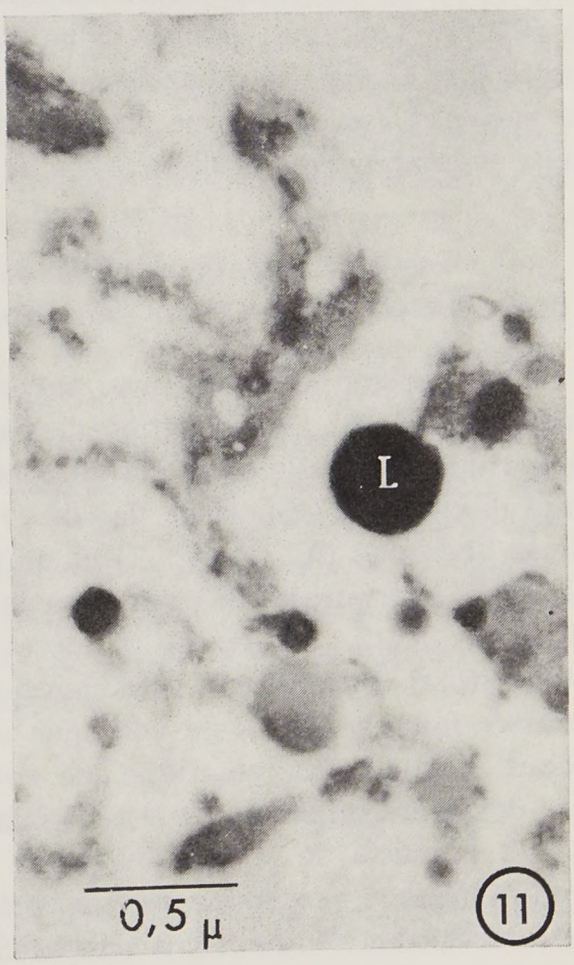
Après 24 h de protéolyse, les résidus non digérés sont formés de petits fragments fibrillaires et de globules lipidiques (× 30 000).

Pl. III









compactes et lisses de type gliadine (G) et celles de type gluténine (g) sont également dégradées. Quelques enroulements de filaments identiques à ceux de la figure 5 sont visibles sur certaines préparations non présentées ici. Les globules lipidiques (L) ne montrent pas d'altération apparente. On assiste ensuite à une fragmentation de plus en plus poussée de l'ensemble du réseau protéique. Au bout de 5 h de protéolyse, bien que 13 p. 100 seulement d'azote soient solubilisés, celui-ci apparaît très réticulé (fig. 10) comme dans le cas de la gluténine et de la gliadine.

Après 24 h (fig. 11), la préparation n'est plus constituée que par des résidus de structure ténue et granuleuse qui semblent constitués par des enchevêtrements de fibrilles. De nombreux globules lipidiques (L) provenant essentiellement des lipides libres de la farine (Crozet et Guilbot) restent associés à ces fractions. Leur taille est sensiblement plus importante, comme si un rassemblement de ces lipides intervenait lors d'une dégradation très poussée des protéines. Il faut noter que l'hydrolyse obtenue pour des temps plus longs (24 h) n'est pas uniquement due à l'action de la protéase ajoutée ; en effet, sur un échantillon témoin non représenté sur la figure, on remarque une altération importante de la structure du gluten ; ceci est probablement dû à des effets d'autolyse. Pour des temps plus courts (de 1 h à 5 h de protéolyse) la transformation de l'échantillon témoin est peu significative.

La trypsine provoque des modifications structurales comparables à celles que donne la protéase fongique. La dégradation de la gluténine obtenue après 2 h d'hydrolyse trypsique (fig. 3, Pl. I), correspondant à 19 p. 100 d'azote solubilisés, est semblable à celle observée après 5 h de réaction avec la protéase fongique (fig. 2, Pl. I). Le gluten subit des altérations du même type sous l'action des deux protéases. Toutefois, pour la gliadine, on remarque seulement au bout de 2 h de protéolyse (5,4 p. 100 d'azote solubilisés) (fig. 7, Pl. II) l'apparition de trous dans la masse et l'on ne trouve pas d'enroulements de filaments concentriques tels que ceux présentés dans la figure 6.

2. — *Modifications ultrastructurales de la gliadine, de la gluténine et du gluten sous l'action de la pepsine*

La pepsine entraîne une transformation rapide et importante des structures conduisant à l'apparition de petits fragments fins et ténus. Ceci est surtout remarquable dans le cas de la gliadine (fig. 12, Pl. II) qui possède alors une structure discontinue constituée par des enchevêtrements de fibrilles semblable à celle de la gluténine (fig. 13, Pl. I) et du gluten total. Ces microphotographies ont été obtenues à la suite d'une protéolyse de 2 h, les quantités de N solubilisé étant respectivement de 14,5 p. 100, 20 p. 100 et 17 p. 100 pour la gliadine, la gluténine et le gluten total. Par ailleurs, l'examen de protéines ayant subi une dégradation moins poussée nous a permis de voir que la digestion pepsique n'est pas homogène. En début d'attaque enzymatique, de petits amas de structure fine sont créés alors que des zones importantes restent relativement intactes.

A l'inverse de la trypsine et de la protéase fongique qui semblent attaquer simultanément l'ensemble de la protéine, la pepsine hydrolyse plus sélectivement certaines zones conduisant à l'apparition rapide de petits fragments qui paraissent formés par des fibrilles de faibles dimensions.

DISCUSSION

Si l'on compare les modes de dégradation par la trypsine et par la pepsine, on observe au microscope électronique des différences nettes au niveau des protéines du gluten. Ceci recoupe les résultats obtenus par d'autres méthodes, en particulier par VERMA et MCCALLA (1966) et YANG et MCCALLA (1966) qui ont montré que la pepsine et la trypsine ont une action différente sur les protéines du gluten ; la trypsine, d'après ces auteurs, serait dans le cas du gluten moins effective que la pepsine et donnerait des fragments de taille inférieure. Dans le cas de la gluténine, OKA, BABEL et DRAUDT (1965) signalent qu'une digestion pepsique conduit, par un clivage rapide, à la formation de polypeptides de grandes dimensions qui sont ensuite dégradés en chaînes plus courtes. BIETZ et ROTHFUS (1970) notent, par ailleurs, des similitudes dans les chromatogrammes par échange d'ions d'hydrolysats pepsiques de gliadine et de gluténine et ils suggèrent qu'il existe des séquences polypeptidiques semblables dans ces fractions. Il semble que l'on puisse mettre en parallèle ces résultats avec nos propres observations ; en effet, les résidus de dégradation par la pepsine contiennent de petits amas de fibrilles qui peuvent correspondre à des polypeptides de faibles dimensions ; de plus, les résidus de gliadine et de gluténine présentent des structures semblables.

Dans le cas de la protéase fongique, après une hydrolyse prolongée le gluten résiduel est constitué par des globules lipidiques et des réseaux fibrillaires probablement riches en lipoprotéines : leur structure permet en effet de les rapprocher de certains résidus cellulaires lipoprotéiques décrits dans le gluten par SIMMONDS (1973).

La protéolyse de la gliadine met en évidence des fractions lipoprotéiques de structure particulière. D'après PONTE, DE STEFANIS et COTTON (1967) et HOSENEY, FINNEY et POMERANZ (1970), les lipides polaires liés à la gliadine seraient surtout constitués de glycolipides ; ils seraient répartis de façon plus ou moins uniforme et liés aux protéines par des groupements hydrophobes (HOSENEY, FINNEY et POMERANZ, 1970). Nous pensons qu'après rupture de liaisons au cours de la protéolyse, des glycolipides pourraient être libérés et reformer de nouvelles associations sous la forme de filaments concentriques, la présence de protéines masquant en partie la structure membranaire de ces arrangements (fig. 6 *b*, Pl. II).

Dans le gluten total, la protéolyse entraîne la formation de certains enroulements lamellaires mais en nombre limité. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans le gluten, selon l'hypothèse d'HOSENEY, FINNEY et POMERANZ (1970) certains lipides liés, notamment des glycolipides, le sont à la fois au niveau de la gliadine par des liaisons hydrophobes, et de la gluténine par des liaisons hydrophiles. Il faut de plus tenir compte des associations qui peuvent intervenir entre les complexes protéiques de la gliadine et de la gluténine.

CONCLUSION

Ce travail, qui s'inscrit dans un cadre plus général d'étude ultrastructurale des lipoprotéines de la farine de blé et du gluten, nous a permis d'observer l'évolution de certains composants lipoprotéiques au cours de différents types d'hydro-

lyse enzymatique. Nous avons pu voir d'une part que chaque fraction se comporte de façon différente selon la protéase utilisée, et d'autre part qu'une même enzyme peut provoquer des modifications structurales variables avec le substrat considéré.

Deux points principaux sont à souligner, qui nous semblent constituer un apport original à notre connaissance de la structure de ces constituants : la digestion pepsique met en évidence des résidus d'aspects semblables pour la gliadine et la gluténine ; l'hydrolyse par la protéase fongique semble « démasquer » certaines fractions lipoprotéiques de la gliadine.

Il nous semble donc que cette méthode d'approche, très qualitative et globale, permet cependant d'obtenir des résultats qu'il serait possible de mettre en parallèle avec certaines propriétés technologiques.

Reçu pour publication en mars 1974.

SUMMARY

SUBMICROSCOPIC STRUCTURE OF PROTEIN FRACTIONS FROM CORN GLUTEN DURING HYDROLYSIS BY VARIOUS PROTEOLYTIC ENZYMES

Structure changes of gluten, gliadin and glutenin during hydrolysis by various enzymes are observed by electron microscopy. A fongic protease industrially prepared and two more specific enzymes, trypsin and pepsin, are used.

The fongic protease gives a degradation by hole formation in the protein matrix ; in gliadin, it also reveals lamellar structures to be compared with lipoprotein ones observed in various materials by different authors. Ultrastructural changes of gluten are examined as a function of hydrolysis time.

In most cases, trypsin gives changes similar to those produced by fongic protease ; however, pepsin leads to a different modification of the structure of proteins which appear as little fragments of fibrillar aggregates.

RESUMEN

ESTRUCTURA SUBMICROSCOPICA DE LAS FRACCIONES PROTEICAS DEL GLUTEN DE TRIGO SOMETIDAS A LA ACCION DE DISTINTOS ENZIMAS PROTEOLITICOS

Las modificaciones de estructura del gluten y de sus dos principales fracciones, la gliadina y la glutenina, sometidas a la acción de distintas proteasas, han sido observadas por microscopia electrónica. Han sido utilizadas una proteasa de origen fúngico, preparada industrialmente, y dos enzimas más específicas : la tripsina y la pepsina.

La proteasa fúngica acarrea una degradacíon por formación de agujeros en la masa proteica. En la gliadina provoca la aparición, además, de disposiciones laminares comparables a ciertas estructuras lipoproteicas observadas en substratos variados por diferentes autores. Las modificationes ultraestructurales del gluten han sido examinadas en función del lapso de tiempo de proteólisis.

Si, en el conjunto, la tripsina provoca alteraciones semejantes a las producidas por la proteasa industrial, la pepsina modifica de forma diferente la estructura de las proteinas que toman entonces el aspecto de pequeñas conglomeraciones formadas por reuniones fibrilares.

RIASSUNTO

STRUTTURA SUBMICROSCOPICA DELLE FRAZIONI PROTEICHE DEL GLUTINE DI GRANO SOTTOPOSTE ALL'AZIONE DI VARI ENZIMI PROTEOLITICI

Le modifiche di struttura del glutine e delle sue due principali frazioni, la gliadina e la gluteina, sottoposte all' azione di varie proteasi sono osservate mediante microscopia elettronica ; sono stati utilizzati una proteasi proveniente da funghi preparata industrialmente e due enzimi più specifici : la tripsina e la pepsina.

La proteasi tratta da funghi provoca una degradazione mediante formazione di fori nella massa proteica ; nella gliadina, essa fa apparire inoltre delle arrangiamenti lamellari paragonabili ad alcune strutture lipoproteiche osservate da parechi autori in differenti substrati. Le modifiche ultrastrutturali del glutine sono state esaminate in funzione della durata della proteolisi.

Se, nell'insieme, la tripsina dà luogo a delle alterazioni simili a quelle provocate dalla proteasi industriale, la pepsina invece modifica in modo diverso la struttura delle proteine che assumono l'aspetto di piccoli mucchi costituiti da raggruppamenti fibrillari.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bietz J. A., Rothfus J. A., 1970. Comparison of peptides from wheat gliadin and glutenin. *Cereal Chem.*, **47**, 381-392.

Bietz J. A., Rothfus J. A., 1971. Differences in aminoacid sequences of gliadin and glutenin. *Cereal Chem.*, **48**, 677-690.

Crozet N., Godon B., Petit L., Guilbot A., 1974. Submicroscopic structure of wheat flour and gluten lipoprotein components. *Cereal Chem.*, **51**, 288-299.

Crozet N., Guilbot A., 1974. Influence of osmic fixation on wheat flour lipids. Observation by transmission and scanning electron microscopy. *Cereal Chem.*, **51**, 300-304.

Hoseney R. C., Finney K. F., Pomeranz Y., 1970. Functional breadmaking and biochemical properties of wheat flour components. VI. Gliadin-lipid-glutenin interaction in wheat gluten. *Cereal Chem.*, **47**, 135-140.

Kaye G., Moses M. J., 1960. *Anat. Rec.* 136, 222 ; in Magnan, 1961, *Traité de Microscopie électronique*, C. Hermann, Paris.

Mills G. L., 1954. Some observations on electrophoresis of gliadin. *Biochem. Biophys. Acta*, **14**, 274.

Oka S., Babel F. J., Draudt H. N., 1965. Proteolytic action of pepsin on glutenin. *J. Food Sci.*, **30**, 212.

Ponte J. G., De Stefanis V. A., Cotton R. H., 1967. Studies of gluten lipids. I. Distribution of lipids in gluten fractions separated by solubility in 70 p. 100 ethanol. *Cereal. Chem.*, **44**, 427-435.

Simmonds D. H., 1973. Wheat grain morphology and its relationship to dough structure. *Cereal Chem.*, **49**, 324-335.

Stoekenius W., 1959. An electron microscope study of myelin figures. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 491-500.

Verma S. C., McCalla A. G., 1966. Enzymatic hydrolysis of dispersed wheat gluten. *Cereal Chem.*, **43**, 28-34.

Yang H. J., McCalla A. G., 1968. Action of proteolytic enzymes on wheat gluten. *Can. J. Biochem.*, **46**, 1019-1022.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 65-74.

DIFFÉRENCES VARIÉTALES PARMI LES HYDROCARBURES MONOTERPÉNIQUES DE L'HUILE ESSENTIELLE DES BOURGEONS DE CASSIS

A. LATRASSE et B. LANTIN*
avec la collaboration technique de Françoise MAGNON

Station de Technologie des Produits végétaux, I. N. R. A., B. V. 1540, 21034 Dijon Cedex

* *Station de Recherches d'Arboriculture fruitière, I. N. R. A., Domaine de Bois l'Abbé, Beaucouzé, 49000 Angers*

RÉSUMÉ

La composition de la fraction légère de l'huile essentielle de bourgeons de cassis est une caractéristique variétale constituant un critère d'identité. Elle peut être utilisée aussi comme un contrôle technologique de la qualité des essences.

Une macération hydroalcoolique (70° GL) de bourgeons est extraite par entraînement à la vapeur d'eau et le distillat recueilli est directement analysé par chromatographie en phase gazeuse. Les composés majeurs sont identifiés par spectrographie infra-rouge et par spectrométrie de masse. Dix-huit variétés ont pu être réparties en 3 familles, A, B et C, caractérisée chacune par les composés majeurs présents dans la fraction légère de leur essence :

A : sabinène (75 p. 100) ;
B : sabinène (58 p. 100) ; Δ_3-carène (21 p. 100) ; terpinolène (10 p. 100) ;
C : Δ_3-carène (36 p. 100) ; β-phellandrène (20 p. 100) ; terpinolène (15,5 p. 100).

Les essences C ont une qualité olfactive supérieure aux essences B, elles-mêmes supérieures à A.

Mots clés : *cassis, bourgeon, huiles essentielles, variétés, monoterpènes.*

INTRODUCTION

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des huiles essentielles extraites des bourgeons de diverses variétés de cassis a révélé des différences qualitatives de composition. Cette observation a été faite la première fois sur des échantillons prélevés

dans des exploitations bourguignonnes au mois de février 1972. Une étude systématique a ensuite été entreprise sur des échantillons de bourgeons de 18 variétés, prélevés dans la collection de la Station d'Arboriculture fruitière de l'I. N. R. A. à Angers.

En avril 1907, le bulletin de la Maison SCHIMMEL mentionnait la présence de *p*-cymène, reconnaissable à son odeur, dans l'huile essentielle de bourgeon. En 1937, GLICHITCH et IGOLEN caractérisent chimiquement le β-pinène, le sabinène, le caryophyllène, le *d*-cadinène, et soupçonnent la présence du sabinol, d'un mélange de terpinéols et d'un alcool sesquiterpénique non identifié.

La séparation des constituants de l'essence par chromatographie en phase gazeuse et leur identification par spectrographie infra-rouge et spectrométrie de masse approfondissent de façon spectaculaire la connaissance de cette huile essentielle.

L'analyse d'ANDERSON, BOSVIK et VON SYDOW en 1963, celle d'ANDERSON et VON SYDOW en 1964, révèlent respectivement un grand nombre de terpènes communs dans les essences de la feuille et du fruit (variété *Brödtorp*). La plupart de ces terpènes se retrouvent aussi dans l'essence du bourgeon et sont cités par LATRASSE (1969), LATRASSE et DEMAIZIÈRES (1971), FRIDMAN, EIGES et KORSHUNOR (1971). L'analyse la plus récente de cette essence (variétés *Baldwin* et *Raven A.*) est donnée par WILLIAMS (1972) qui mentionne de façon exhaustive les composés identifiés jusqu'ici dans les essences du bourgeon, de la feuille et du fruit.

Notre étude a révélé des différences variétales déterminantes dans la composition de l'huile essentielle des bourgeons de cassis.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. — *Caractérisation variétale*

Un échantillon de 5 à 10 g de bourgeons est mis en macération dans 100 ml d'une solution hydro-alcoolique titrant 70° GL. L'essence est extraite par entraînement à la vapeur d'eau. Le distillat, recueilli volume à volume, est limpide (l'éthanol solubilise l'essence). On l'analyse directement par chromatographie en phase gazeuse, dans les conditions suivantes.

Appareil à ionisation de flamme de la série 1400 de Varian.

colonne : 6 m × 3 mm ; inox
Chromosorb W-aw-HMDS-80/100 mesh
Carbowax 20 M à 15 p. 100

analyse : isotherme : 150°C
t° injection : 220°C
t° détection : 220°C
gaz vecteur : N_2-25 ml/mn
volume injecté : 1 µl
étalon interne : *n*-hexanol.

Les pics chromatographiques sont repérés par leurs volumes de rétention relatifs à celui de l'hexanol ($V'_{R'}$ /hexanol) et les proportions des divers composés sont calculées par planimétrie.

B. — *Identification des composés majeurs*

Les hydrocarbures ont été isolés suivant la technique de déterpénation de KIRCHNER et MILLER (1952). Elle consiste à éluer les huiles essentielles sur une colonne d'acide silicique au moyen d'un solvant apolaire comme le pentane ou l'hexane. Les composés polaires restent fixés sur la colonne.

On prépare un extrait par macération des bourgeons dans du pentane purifié (20 g de bourgeons sont mis à macérer dans 150 ml de pentane pendant 8 jours). Cette macération, colorée par des pigments jaunes (xanthophylles, caroténoïdes), traverse une colonne d'acide silicique thermostatée à 15°C (colonne de 15 cm, 2 cm de diamètre, silice Mallinckrodt ; 100 mesh). Les hydrocarbures sont élués rapidement alors que les pigments jaunes migrent très lentement. L'éluat incolore est concentré, puis analysé.

Un composé, le sabinène (ou 4-10 thuyène) a été isolé par chromatographie en phase gazeuse préparative et identifié par son spectre de masse et son spectre infra-rouge.

Chromatographie préparative.

Appareil Autoprep A 700 de Aerograph, équipé d'un catharomètre.

colonne : 6 m × 6 mm ; inox
Chromosorb W-HMDS-60/80 mesh
Carbowax 20 M à 20 p. 100.

analyse : isotherme : 90°C
t° injection : 200°C
t° détection : 200°C
gaz vecteur : H_2 60 ml/mn
injections répétées de 50 µl.

Spectrographie infra-rouge.

Appareil IR 8 de Beckmann ; analyse en solution (tétrachlorure de carbone). Le spectre du sabinène est donné dans l'étude de Mitzner, Theimer et Freemann (1965).

Spectrométrie de masse.

Les analyses ont été réalisées par couplage d'un chromatographe (Girdel) et du spectromètre de masse CH 5 de Varian-MAT (température de source 250°C, énergie d'ionisation 70 eV). Les spectres de masse ont été identifiés par comparaison avec ceux publiés dans les études de Ryhage et Von Sydow (1963) et de Thomas et Wilhalm (1964).

TABLEAU I

Techniques utilisées pour l'identification des composés majeurs

Composés	CPG	SM	IR
sabinène		×	×
Δ_3-carène	×	×	× (1)
limonène	×	×	× (1)
β-phellandrène		×	× (1)
terpinolène		×	

CPG : chromatographie en phase gazeuse ;
SM : spectrométrie de masse ;
IR : spectrographie infra-rouge.

(1) Latrasse et Demaizières, 1971.

Les cinq composés majeurs qui ont permis la discrimination variétale sont cités dans les études rappelées dans l'introduction de cet article. Le tableau 1 indique comment nous les avons identifiés.

Les formules des hydrocarbures monoterpéniques majeurs sont rappelées (fig. 1).

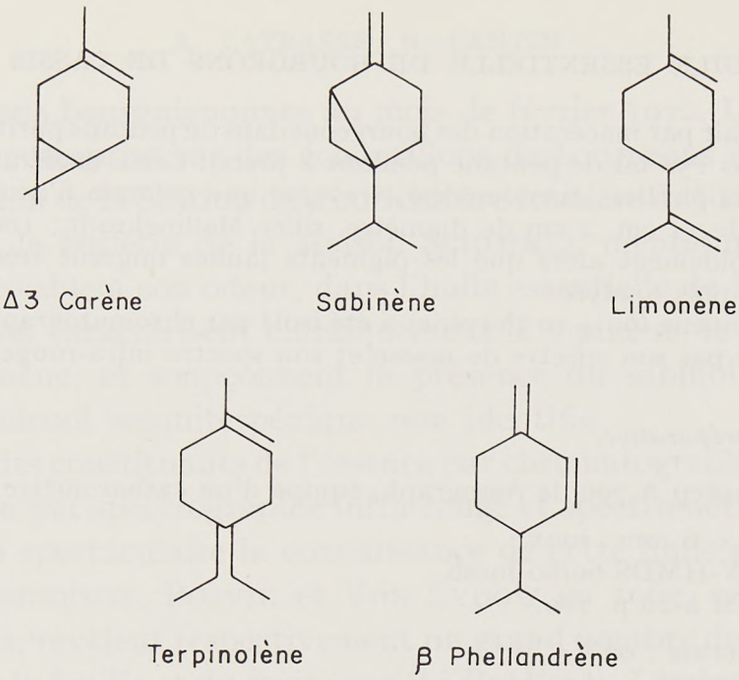


FIG. 1. — *Les hydrocarbures monoterpéniques majeurs*

TABLEAU 2

Principaux composés de la fraction légère des huiles essentielles de bourgeons de cassis

Nature des pics majeurs	Sabinène	Δ_3-carène	Limonène	β-Phellandrène (+ X)	Terpinolène
V'_R/hexanol	0,500	0,553	0,662	0,705	0,900
	Proportions relatives en p. 100				
Famille A					
Mendip cross *Cotswold cross* *Tor cross* *Malvern cross* *Golubka* *M. 59-3*	75	0	12	Traces	Traces
Famille B					
Silvergieter	57,6	20,1	4,8		10,5
Rosenthal	56,5	22,7	4,8		10,9
Baldwin	61,7	19,7	4,3		9,6
Wellington XXX	55,8	21,5	4,7		10,9
Goliath	58,2	20,5	2,2	Traces	10,1
Victoria	60,4	19,9	3,9		10,0
Consort	58,3	21,8	2,3		11,1
Tenah 8	58,8	19,6	3,9		9,1
Davison 8	58,4	21,8	3,4		9,7
Moyenne	58,4	20,7	3,8	Traces	10,1
Famille C					
Noir de Bourgogne (1)		37,3	11,4	19,8	16,3
Royal de Naples		38,3	9,8	18,0	13,5
Brodtorp		32,1	11,8	24,0	17,0
Moyenne		35,9	11,0	20,6	15,6

(1) Les proportions relatives sont les moyennes obtenues avec 10 clones de *Noir de Bourgogne*.

RÉSULTATS

En fonction de la nature des huiles essentielles rencontrées, les 18 variétés étudiées se répartissent en 3 familles, A, B et C (tabl. 2). Le limonène, présent dans toutes les essences, n'est pas un composé discriminant.

La composition de la fraction légère des essences de la famille A est la plus simple (fig. 2). Le sabinène est le composé principal (75 p. 100), le limonène est le second constituant majeur (12 p. 100). Les 13 p. 100 résiduels sont formés d'hydrocarbures monoterpéniques à l'état de traces, qui n'ont pas été identifiés.

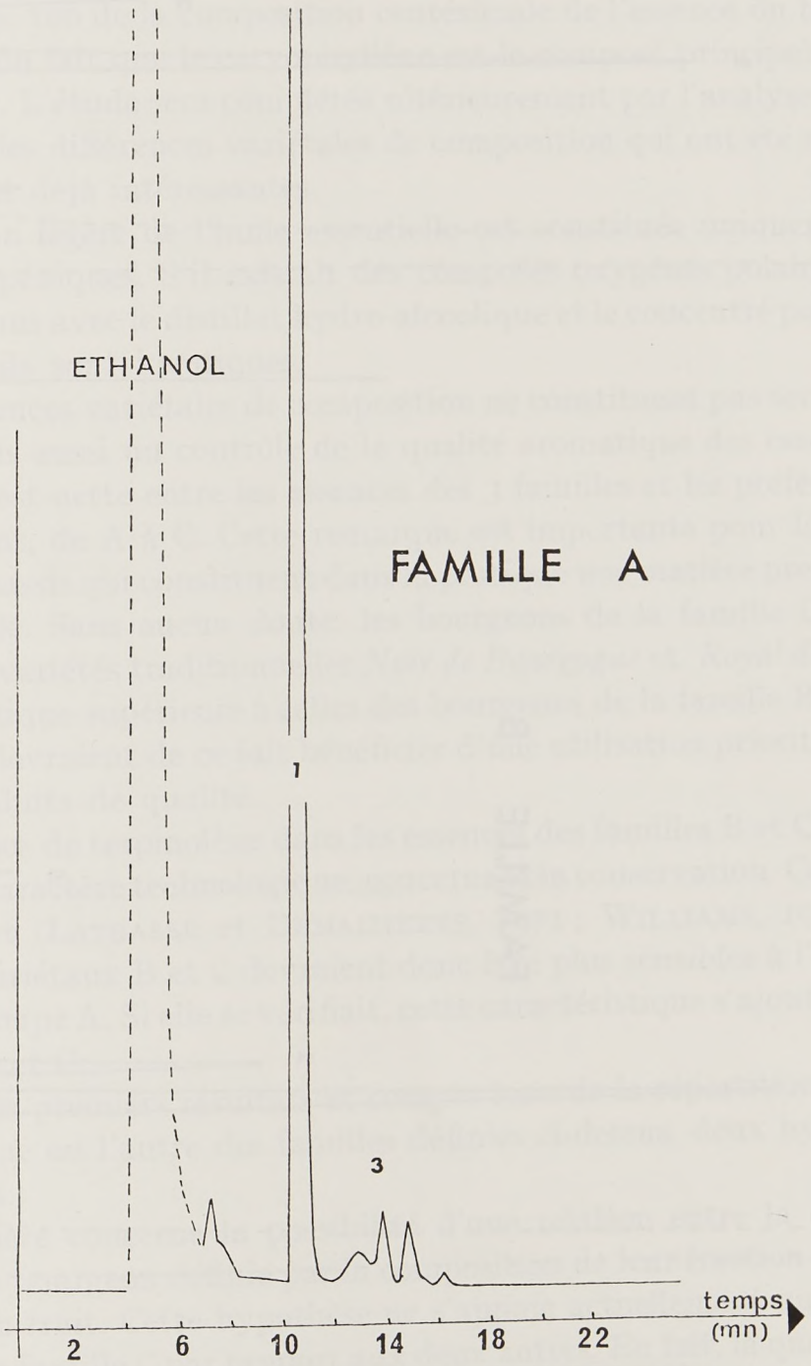


FIG. 2. — *Chromatogramme de la fraction légère des essences de la famille A*
(1) : sabinène ; (3) : limonène

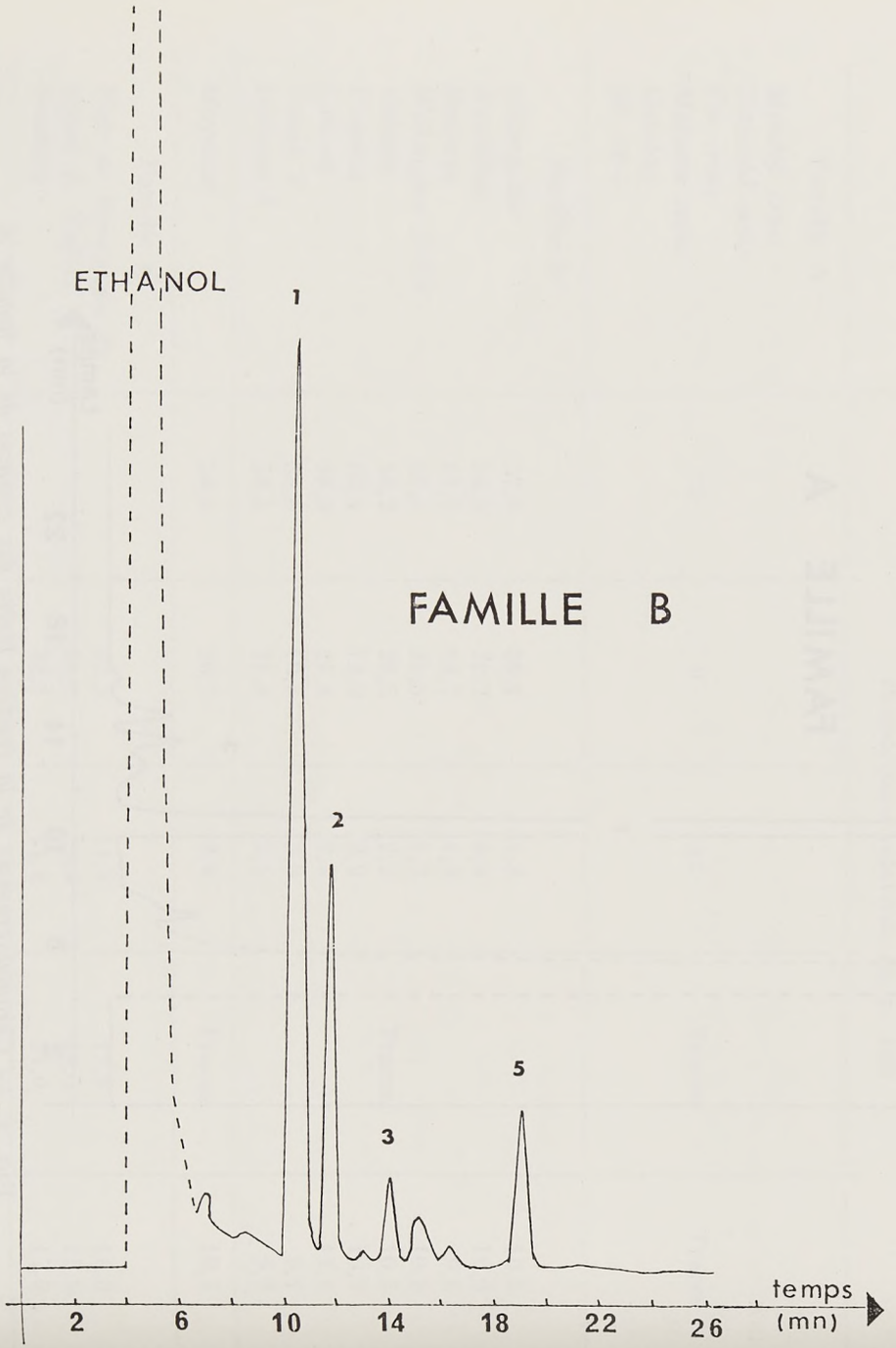


FIG. 3. — *Chromatogramme de la fraction légère des essences de la famille B*

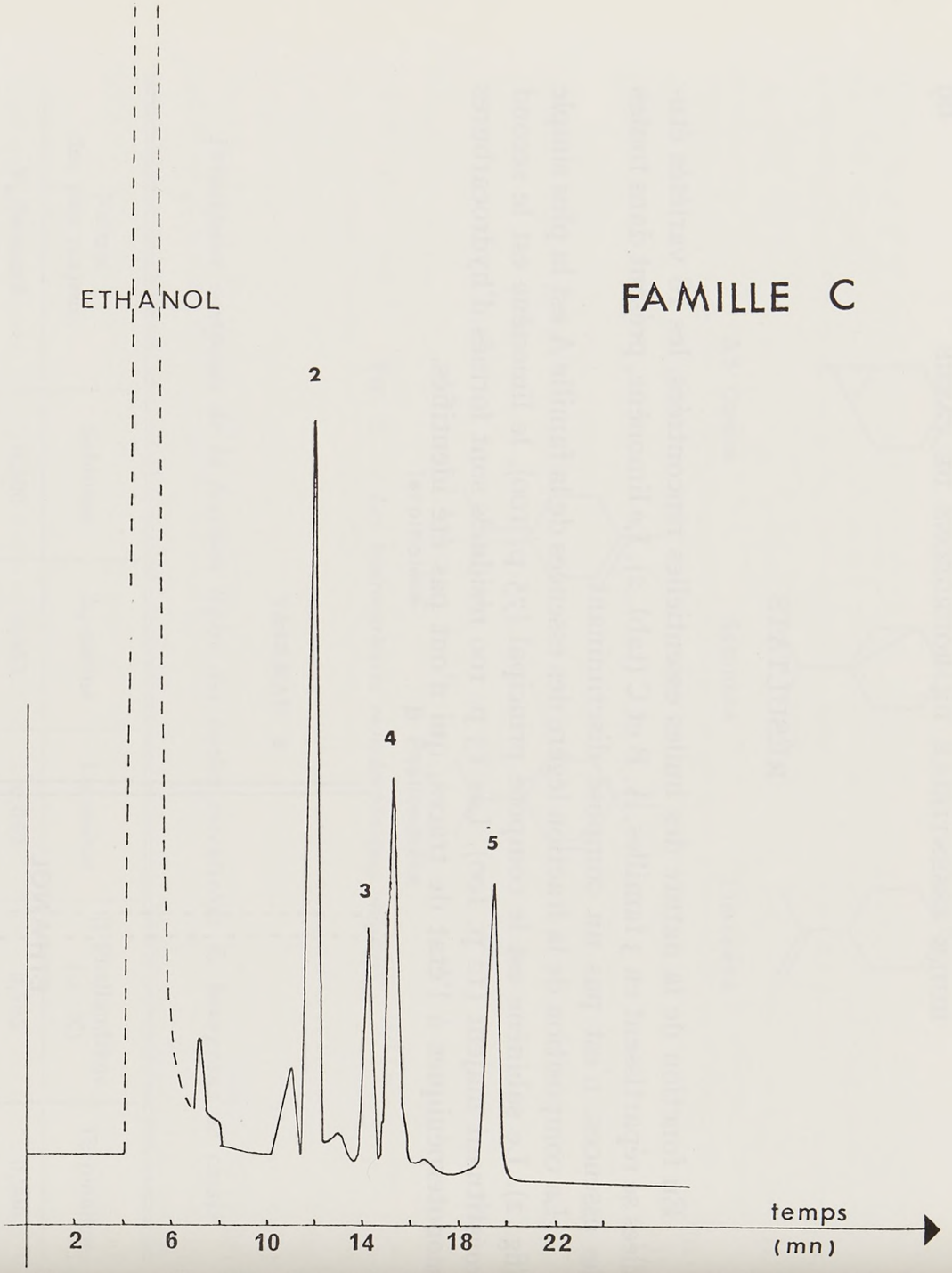


FIG. 4. — *Chromatogramme de la fraction légère des essences de la famille C*

Le sabinène (58 p. 100) est aussi le composé principal des essences de la famille B dans lesquelles le Δ_3-carène (20,7 p. 100) et le terpinolène (10,1 p. 100) sont les 2 autres composés majeurs (fig. 3).

Les essences de la famille C sont caractérisées par 3 composés majeurs, le Δ_3-carène (35,9 p. 100), le β-phellandrène (20,6 p. 100) et le terpinolène (15,6 p. 100) (fig. 4).

L'analyse des essences de 10 clones de *Noir de Bourgogne* a donné des chromatogrammes identiques.

DISCUSSION

Notre attention s'est d'abord portée sur l'analyse de la fraction légère, car elle représente 80 p. 100 de la composition centésimale de l'essence du bourgeon. Elle est justifiée aussi du fait que le caryophyllène est le composé principal (16 p. 100) de la fraction lourde. L'étude sera complétée ultérieurement par l'analyse de cette dernière fraction, mais les différences variétales de composition qui ont été mises en évidence nous paraissent déjà intéressantes.

La fraction légère de l'huile essentielle est constituée uniquement d'hydrocarbures monoterpéniques. S'il existait des composés oxygénés polaires, les chromatogrammes obtenus avec le distillat hydro-alcoolique et le concentré pentanique seraient différents, or ils sont identiques.

Les différences variétales de composition ne constituent pas seulement un critère d'identité, mais aussi un contrôle de la qualité aromatique des essences. La distinction olfactive est nette entre les essences des 3 familles et les préférences vont, dans l'ordre croissant, de A à C. Cette remarque est importante pour la valorisation des bourgeons de cassis qui constituent dans la pratique une matière première aromatique non négligeable. Sans aucun doute, les bourgeons de la famille C, comprenant en particulier les variétés traditionnelles *Noir de Bourgogne* et *Royal de Naples*, ont une qualité aromatique supérieure à celles des bourgeons de la famille B et *a fortiori* de la famille A. Ils devraient de ce fait bénéficier d'une utilisation prioritaire dans la fabrication de produits de qualité.

La présence de terpinolène dans les essences des familles B et C suscite une autre remarque de caractère technologique, concernant la conservation. Ce composé s'oxyde très facilement (Latrasse et Demaizières, 1971 ; Williams, 1972). Les essences des groupes variétaux B et C devraient donc être plus sensibles à l'oxydation que les essences du groupe A. Si elle se vérifiait, cette caractéristique s'ajouterait à la défaveur des groupes B et C.

Suite à ces premiers résultats et compte tenu de la répartition des variétés étudiées dans l'une ou l'autre des familles définies ci-dessus, deux hypothèses peuvent être formulées.

La première concerne la possibilité d'une relation entre la qualité des huiles essentielles du bourgeon définie par la composition de leur fraction légère et la valeur aromatique du fruit. Cette hypothèse ne s'appuie actuellement que sur les résultats comparés de la famille C par rapport aux deux autres. En fait, la question est de savoir si la supériorité qualitative évidente d'une variété comme *Noir de Bourgogne*, tant au niveau du bourgeon qu'au niveau du fruit, est due au seul fait du hasard ou s'il

Fig. 3. — *Chromatogramme de la fraction légère des essences de la famille B* Fig. 4. — *Chromatogramme de la fraction légère des essences de la famille C*

existe une relation quelconque, d'ordre génétique, entre ces deux caractères. La confirmation d'une telle relation fournirait, dans le cadre de la recherche de variétés nouvelles, un critère de sélection précoce particulièrement intéressant.

La seconde hypothèse concerne le déterminisme génétique de la synthèse des différents composés. Pour chacun d'eux en effet, sur l'ensemble des variétés, l'analyse ne révèle pas de variations continues dans les teneurs. Cette observation incite à penser qu'un mécanisme génétique relativement simple est en cause. De plus, certains composés semblent être toujours présents ensemble : la répartition au hasard des 5 composés identifiés parmi 18 variétés d'origines génétiques très diverses aurait conduit à beaucoup plus de trois groupes. On peut donc envisager que quelques précurseurs seulement, communs à plusieurs substances, se transmettent d'une manière simple dans cette espèce. Ces considérations ouvrent la voie pour une définition des meilleurs parents et des meilleures combinaisons susceptibles de produire des hybrides présentant les caractéristiques de la famille C les plus favorables pour la qualité des arômes.

Pour tenter de préciser ces deux points, nous disposons de descendances issues soit d'autofécondations, soit de croisements entre variétés des familles A, B et C. L'analyse systématique, dans un premier temps, de la fraction légère des huiles essentielles des bourgeons de ces individus, dont l'origine est parfaitement connue, devrait rapidement nous renseigner sur la validité de ces hypothèses.

CONCLUSION

Dix-huit variétés de cassis choisies parmi les plus représentatives de l'espèce cultivée ont pu être classées en trois familles distinctes, quant à la composition de la fraction légère des huiles essentielles du bourgeon. Quatre hydrocarbures monoterpéniques majeurs ont été identifiés dans des proportions variées suivant les familles : le sabinène, le Δ_3-carène, le β-phellandrène et le terpinolène. La composition des essences est apparue comme un caractéristique variétale qui, jointe à d'autres aspects morphologiques ou physiologiques de la plante, aidera à son identification. Par ailleurs, du fait de l'utilisation fréquente, en liquoristerie, de bourgeons de cassis dans les macérations, l'analyse chromatographique de ces essences peut constituer un contrôle de qualité appréciable susceptible de favoriser la valorisation des variétés les plus aromatiques.

Reçu pour publication en mars 1974.

REMERCIEMENTS

Nous remercions M. RIGAUD qui a exécuté les spectres de masse et M. BOUDIER qui nous a fourni les premiers échantillons de bourgeons.

SUMMARY

VARIETAL DIFFERENCES BETWEEN THE MONOTERPENE HYDROCARBONS OF THE ESSENTIAL OIL OF BLACK CURRANT BUDS

The composition of the low boiling fraction of the essential oil of black currant buds is a varietal feature which can be used as a criterion for identification and as quality control for flavour. A hydroalcoolic maceration (70° GL) of 5 to 10 g of buds is extracted by steam distillation and the distillate obtained is directly analysed by gas-liquid chromatography. The major compounds are identified by I. R. spectrography, mass spectrometry. Three families A, B and C can be distinguished amongst the eighteen cultivars examined. The following major compounds have been identified in these families :

A : sabinene (75 p. 100) ;
B : sabinene (58 p. 100) ; Δ_3-carene (21 p. 100) ; terpinolene (10 p. 100) ;
C : Δ_3-carene (36 p. 100) ; β-phellandrene (20 p. 100) ; terpinolene (15,5 p. 100).

The oils C have the best flavour quality, the oils B are superior to essences A.

RESUMEN

DIFERENCIAS VARIETALES ENTRE LOS HIDROCARBUROS MONOTERPENICOS DEL ACEITE VOLATIL DE LOS BROTES DE GRESELLENO NEGRO

La composición de la fracción ligera del aceite volátil de brotes de grosellero negro constituye una característica varietal que determina un criterio de identidad. Esta composición puede ser utilizada también para un control tecnológico de la calidad de las esencias.

Una maceración hidroalcohólica (70°GL) de brotes es extraida por arrastre al vapor de agua y el destilado recogido es analizado directamente por cromatografía en fase gaseosa. Los compuestos principales son identificados por espectrografía infrarroja y por espectrometrñia de masa. Dieciocho variedades han podido así ser repartidas en tres familias : A, B y C, cada una de las mismas caracterizada por los compuestos principales presentes en la fracción ligera de sus esencias :

A : sabineno (75 p. 100) ;
B : sabineno (58 p. 100) ; Δ_3-careno (21 p. 100) ; terpinoleno (10 p. 100) ;
C : Δ_3-careno (36 p. 100) ; β-felandreno (20 p. 100) ; terpinoleno (15, 5 p. 100).

Las esencias C tienen una calidad olfactiva superior a las esencias B que — a su vez — son superiores a A.

RIASSUNTO

DIFFERENZE DI VARIETA' TRA GLI IDROCARBURI MUNOTERPENICI DELL'OLIO ESSENZIALE DEI POLLONI DI RIBES NERO

La composizione della frazione leggera dell'olio essenziale di polloni di ribes nero è una caratteristica di varietà che costituisce un criterio d'identità. Essa puo' essere utilizzata egualmente come controllo tecnologico della qualità delle essenze.

Una macerazione idroalcoolica (70°GL) di polloni è estratta mediante passaggio di vapore d'acqua e il distillato raccolto viene direttamente analizzato tramite cromatografia in fase gassosa. I composti maggiori sono identificati mediante spettrografia infrarossa e spettrometria di

massa. E' stato possibile suddividere diciotto varietà in 3 famiglie A, B e C, ognuna caratterizzata dai composti maggiori presenti nella frazione leggera delle loro essenze :

A : sabinene (75 p. 100) ;
B : sabinene (58 p. 100) ; Δ_3-carene (21 p. 100) ; terpinolene (10 p. 100) ;
C : Δ_3-carene (36 p. 100) ; β-fellandrene (20 p. 100) ; terpinolene (15,5 p. 100).

Le essenze C hanno una qualità olfattiva superiore alle essenze B le quali a loro volta sono superiori a quelle A.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anderson J., Bosvik R., Von Sydow E., 1963. The composition of the essential oil of black currant leaves (*Ribes nigrum* L.). *J. Sci. Food Agr.*, **14** (11), 834-840.

Anderson J., Von Sydow E., 1964. The aroma of black currants. Higher boiling compounds. *Acta Chem. Scand.*, **18**, 1106-1114.

Fridman S. A., Eiges T. A., Korshunor A. I., 1971. Aromatic substances of european black currant. *Khlebopek Konditer Prom.*, **15** (5), 39 (en russe). (in *Chem. Abstr.*, 1971, **75**, 75083 *m*).

Glichitch L. S., Igolen M. G., 1937. Contribution à l'étude de l'huile essentielle des bourgeons de cassis. *Parfums de France*, **15**, 241-244.

Kirchner J., Miller J., 1952. Preparation of terpeneless essential oils. *Ind. Eng. Chem.*, **44** (2), 318-321.

Latrasse A., 1969. Extraction des principes aromatiques du cassis. Analyse par chromatographie en phase gazeuse. *Ind. aliment. agric.*, (1), 33-37.

Latrasse A., Demaizières D., 1971. Autoxydation de la fraction monoterpénique de l'huile essentielle de bourgeons de cassis (*Ribes nigrum* L.). *Parf. Cosm. Sav. France*, **1** (1), 15-23.

Mitzner B. M., Theimer E. T., Freeman S. K., 1965. The infra-red spectra of monoterpenes and related compounds. *Appl. Spectroscopy*, **19** (6), 169-181.

Ryhage R., Von Sydow E., 1963. Mass spectrometry of terpenes. I. Monoterpene hydrocarbons. *Acta Chem. Scand.*, **17**, 2025-2035.

Schimmel et Cie, 1907. L'huile essentielle du bourgeon de cassis. *Bull. semest.*, avril, 107.

Thomas H. F., Wilhalm B., 1964. Les spectres de masse dans l'analyse. (3e communication). Les spectres de masse des hydrocarbures monoterpéniques. *Helv. Chim. Acta*, **47**, fasc. 2 (55-56), 475-487.

Williams A. A., 1972. Extraction and preliminary gas chromatographic examination of the essential oil of black currant buds. *Jus de fruits. Recherches scientifiques et technologiques*. Symposium F. I. J. U., Dijon, 21-41. Juris Druck und Verlag, Zurich.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 75-95.

ESSAIS DE VINIFICATION DE RAISINS BLANCS AVEC MACÉRATION A BASSE TEMPÉRATURE ET MACÉRATION CARBONIQUE

G. MONTEDORO, P. FANTOZZI et M. BERTUCCIOLI
avec la collaboration technique de N. PASQUINI

Istituto di Industrie agrarie, Università di Perugia
(Italie)

RÉSUMÉ

On a examiné quelques techniques de vinification pour l'amélioration de la production des vins blancs, entre autres la macération du moût à basse température et la macération carbonique.

En ce qui concerne la macération à basse température, on a étudié l'influence du temps de contact (24, 48, 72 h), de la température (5°, 10°, 15°C) et de la centrifugation du moût après macération.

La macération du moût à 5°C pendant 48 heures conduit à une nette amélioration des caractéristiques qualitatives par augmentation des esters.

La centrifugation du moût après macération améliore la stabilité à l'oxydation du vin correspondant.

Quant à la macération carbonique, on a rapporté quelques-uns des résultats les plus importants relatifs aux durées optimales de macération pour deux cépages de raisins blancs les plus couramment cultivés dans l'Italie centrale, le *Greco di Todi* et le *Trebbiano toscano*. Le vin de *Greco di Todi*, parallèlement à une amélioration des caractéristiques qualitatives, subit une perte de stabilité à l'oxydation. Par contre, le vin de *Trebbiano toscano* ne subit ni amélioration évidente de la qualité ni perte de stabilité à l'oxydation.

Mots clés : *raisin blanc, vinification, macération carbonique, macération à basse température, stabilité à l'oxydation.*

I. — INTRODUCTION

L'acceptation par le consommateur des aliments et des boissons est étroitement liée à leurs caractéristiques organoleptiques.

A la formation du bouquet du vin participent de façon déterminante les constituants volatils responsables de l'odeur et les fractions aromatiques qui interviennent dans le goût de la boisson. Ces composés sont soit présents dans le fruit en tant que tels ou à l'état de précurseurs, soit engendrés durant les fermentations.

En œnologie, nous assistons à une évolution vers l'élaboration de vins plus riches en composants organoleptiques caractéristiques du fruit ; ceci est particulièrement vrai pour les vins blancs préférés fruités. Une exaltation de cette qualité, liée à la

technique de vinification et au conditionnement du produit, est obtenue soit à l'aide d'antioxydants et par emploi de gaz inertes de protection, soit avec des procédés qui améliorent l'extraction des constituants aromatiques du raisin.

La technique de macération à froid, avant la fermentation, présente des aspects très intéressants. En effet, le contact des matières solides du fruit avec le jus provoque l'extraction des différents constituants (pectines, polyphénols, substances azotées et aromatiques) qui interviennent directement et indirectement, pendant la fermentation alcoolique, dans la formation des caractéristiques organoleptiques du futur vin (Korotkevich, Gaivoronskaia et Kravchenko, 1950 ; Berg et Akioyshi, 1956 ; Nikandrova, 1957 ; Berg et Akioyshi, 1958 ; Shijo, Muraki et Tada, 1959 et 1961 ; Ough et Amerine, 1961 ; Aubert et Poux, 1969).

Les niveaux de température auxquels ont lieu macération et fermentation influencent notablement le degré et la vitesse d'extraction de ces composants (Singleton et Draper, 1964 ; Aubert et Poux, 1969).

En alternance avec cette technique, on peut aussi utiliser la macération carbonique dont des essais ont été décrits précédemment par nous (Fantozzi et Montedoro, 1971) et par d'autres auteurs (Benard, 1971 ; Benard *et al.*, 1971 ; Ruiz-Hernandez, 1971).

Il nous a donc paru intéressant d'examiner la vinification par macération à froid et d'approfondir l'étude de la macération carbonique. La macération à froid a été expérimentée sur le *Greco di Todi*, la macération carbonique sur deux cépages, le *Trebbiano toscano* et le *Greco di Todi*, dans le but de vérifier pour chacun d'eux la validité d'application de la méthode ; nous cherchions en outre à établir les temps de macération optimaux permettant l'amélioration des caractéristiques organoleptiques et la stabilité à l'oxydation.

Pour les deux techniques de vinification, des essais ont été faits en laboratoire et industriellement (pilote). Leurs principes sont résumés ci-dessous.

Macération à froid : maintien de la vendange foulée et égrappée à des températures et pendant des temps différents, à la fin desquels le moût était séparé des parties solides et soumis à la fermentation.

Macération carbonique : des durées variables de macération du raisin ont été expérimentées. Pour cette dernière expérience, alors que nous retraçons en détail le procédé utilisé, nous donnerons seulement les résultats ayant un intérêt technique majeur.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

1. — *Techniques de vinification*

Les raisins utilisés ont été récoltés dans un vignoble spécialisé de la zone DOC de Torgiano (province de Pérouse) durant la période du 15 au 20 octobre.

a) *Macération à basse température.*

Essais au laboratoire.

Vingt kg de raisins *Greco di Todi*, préalablement refroidis à 5°C, ont été égrappés à la main et pressés à l'aide d'une presse de laboratoire Hafico à la pression de 21 atm/cm². Le moût et le marc, recueillis séparément, ont été répartis dans la proportion obtenue au pressurage, en ballons

de 2 litres. Les échantillons, d'un volume global de 1,5 litre, ont été immédiatement portés aux températures suivantes : 1 flacon à 5°C, 6 flacons à 10°C, 1 flacon à 15°C, avec des temps de macération variables, 24, 48, 72 heures pour l'essai à 10°C, 72 heures pour les essais à 5°C et 15°C. A la fin des macérations, le contenu des ballons a été de nouveau pressuré afin de séparer le moût des parties solides qui étaient éliminées.

Le moût obtenu dans l'un des échantillons de macération à 10°C pendant 72 heures a été également centrifugé avant fermentation pour séparer une partie des matières solides en suspension (enzymes, protéines, tannins, etc.).

Afin de vérifier l'influence séparée des pellicules et des pépins sur la composition polyphénolique du moût et les effets de celle-ci sur la stabilité du vin, une partie aliquote du moût obtenu lors du premier pressurage a été distribuée en fractions égales dans 2 ballons de 2 litres ; pellicules et pépins ont été ajoutés séparément en quantité proportionnelle à la composition d'origine de la baie. Après 72 heures à 10°C, les moûts ont été séparés des pellicules et des pépins.

Un litre de chacun des différents moûts obtenus à partir de l'essai de laboratoire a été mis à fermenter dans les mêmes récipients, fermés avec des bondes hydrauliques, à température ambiante sans sulfitation, en ensemençant avec 20 ml de culture sur moûts de *S. ellipsoïdeus* (souche 20 IMAT).

Cinq mois après la fin de la fermentation, le vin rendu limpide par décantation naturelle a été séparé et filtré sur papier et conservé à 10°C dans des bouteilles fermées au liège et cachetées.

Essai pilote.

Afin de vérifier dans la pratique industrielle les résultats obtenus en laboratoire, nous avons préparé l'expérimentation suivante. Les raisins (une tonne), du même cépage et de même provenance que ceux employés pour les essais en laboratoire, ont été égrappés avec un fouloir-égrappoir centrifuge vertical puis pressés. Le raisin égrappé et foulé a été séparé du moût par gravité. Au marc, transporté dans une cuve dont les parois étaient isolées thermiquement, fut ensuite ajouté le même jus de goutte dont la température avait été préalablement portée à 2°C par recyclage dans un échangeur tubulaire (Padovan, mod. Frigosaturatore 2 000) refroidi par expansion directe d'ammoniac. La température finale de la vendange était 5°C. Après 72 heures de macération, le moût fut de nouveau séparé du marc par léger pressurage avec un pressoir hydraulique (10 atm/cm²) et transporté dans une cuve où, additionné de la même culture sur moût de *S. ellipsoïdeus* (souche 20 IMAT), il fermenta.

Le schéma récapitulatif de tous les essais est reporté dans le tableau 1.

TABLEAU I

Techniques expérimentales. Macération à basse température

	Essais de laboratoire								Essai pilote
	Raisin égrappé Pressurage (1er)								Raisin égrappé-foulé
Macération									
Température (°C)	5	10	10	10	10	10	10	15	5
Temps (h)	72	24	48	72	72	72	72	72	72
Constituants	J + M	J + M	J + M	J + M	J + M	J + P	J + Pe	J + M	J + M
Séparation des jus	par pressurage (2e)								par pressurage
Centrifugat. des jus	—	—	—	—	+	—	—	—	—
	fermentation								fermentation
Filtrat. après 5 mois	+	+	+	+	+	+	+	+	+

J : Jus P : Pellicules + : effectuée
M : Marc Pe : Pépins — : non effectuée

b) *Macération carbonique.*

Les raisins entiers (une tonne) de chaque cépage ont été transportés dans deux cuves en ciment (capacité 5 hl) préalablement saturées en CO_2, puis fermées et munies de bondes hydrauliques ; les raisins de chaque cépage ont été maintenus dans ces conditions pendant 3 jours, à la température de 15-18°C. Au bout de ce temps, après avoir séparé le jus de goutte écoulé, les raisins ont été pressurés à l'aide d'une presse hydraulique, jusqu'à une pression équivalent à 25 atm/cm². Les jus de presse ont fermenté dans des conditions identiques à celles des témoins, mais sans addition de levures.

c) *Vinification classique.*

Les raisins entiers (une tonne) de chaque cépage étaient pressés avec une presse hydraulique jusqu'à une pression équivalent à 25 atm/cm² ; le moût était directement transporté dans une cuve de fermentation et additionné de culture sur moût de *S. ellipsoïdeus* (souche 20 IMAT). La cuve était munie d'une bonde hydraulique ; au bout de 30 jours, on effectuait un soutirage.

2. — *Méthodes analytiques*

Extrait sec, fer, alcool éthylique, acidité totale, acidité volatile, acidité fixe, cendres, alcalinité des cendres ont été dosés selon les méthodes officielles italiennes (M.A.F., 1958).
Alcool méthylique : colorimétriquement avec l'acide chromotropique (Montedoro, 1968 ; Montedoro et Angelini, 1973 *a*).
Azote total : avec la méthode microchimique (A.O.A.C., 1968).
Acides aminés libres : sur l'extrait obtenu après passage du vin sur colonne de Dowex W × 8 (H^+) 50-100 mesh (Kliewer, 1970), soit par colorimétrie avec le réactif à la ninhydrine (acides aminés totaux, Moore et Stein, 1948) soit après séparation par chromatographie en phase gazeuse (Fantozzi et Montedoro, 1973 *a*). Proline : directement sur le vin avec le réactif à la ninhydrine (Ough, 1969).
Polyphénols totaux : par colorimétrie avec le réactif de Folin-Ciocalteu en exprimant les résultats en acide gallique (Singleton, Sullivan et Kramer, 1971).
Polyphénols tanins : par précipitation avec du sulfate de cinchonine en exprimant les résultats en acide gallique (Brugirard et Tavernier, 1952).
Flavonoïdes totaux : par précipitation à la formaldéhyde (Kramling et Singleton, 1969) en exprimant les résultats en acide gallique (Singleton, Sullivan et Kramer, 1971).
Catéchines : par colorimétrie avec la vanilline en exprimant les résultats en D-catéchine (Pompei et Peri, 1971).
Leucoanthocyanes : par extraction avec du Polyclar ; on exprimait les résultats en chlorhydrate de cyanidine (Pompei, Peri et Montedoro, 1971).
Activité polyphénoloxydasique (PPO) : par la méthode à la purpurogalline (Montedoro, 1969).
Constituants volatils : ils ont été déterminés avec une méthode originale qui analysait la composition de la partie volatile constituant l'espace de tête, grâce à une adsorption sur Porapak Q 80-100 mesh, suivie d'une désadsorption faite directement dans le four du chromatographe après liaison à la colonne chromatographique. Avec ce procédé, dont les détails seront rapportés dans une note en cours de rédaction (Bertuccioli et Montedoro, 1973), l'espace de tête de 200 ml de vin était examiné dans des conditions rigoureusement standardisées. Les conditions opératoires étaient les suivantes. Colonne d'acier inox, diamètre 1/8 de pouce, longueur 90 cm, garnie de Porapak Q 80-100 mesh préalablement lavé à l'acétone et activé pendant 12 heures à 225°C. Température de la colonne 50°C au début, 1°6 C/mn pendant 30 minutes, 4°4 C/mn pendant 15 minutes, 85°C/mn jusqu'à 225°C, isotherme. Température du détecteur : 280°C. Courant d'azote 30 ml/mn. Un chromatogramme représentatif est reporté sur la figure 1.
Acides organiques et acides-phénols : par chromatographie en phase gazeuse (Fantozzi, 1971 ; Fantozzi et Montedoro, 1972).
Couleur : directement sur le vin, en déterminant la densité optique (450 nm) dans une cuve en verre de 10 mm.
Stabilité de la couleur à l'air :

— à température ambiante (test casse oxydasique) en maintenant 50 ml de vin dans un erlen de 200 ml, bouché à l'émeri, en agitant sur un agitateur à rotation horizontale à 50 tr/mn pendant 24 heures. Après ce laps de temps, la densité optique (450 nm) était déterminée sur le vin filtré.

— à chaud (test de madérisation accélérée) : 50 ml de vin étaient déposés dans une bouteille de 250 ml et soumis à une agitation sur un agitateur à rotation verticale à une température de 50°C. Après 48 heures, la densité optique (450 nm) était déterminée sur le vin centrifugé (Montedoro, données non publiées).

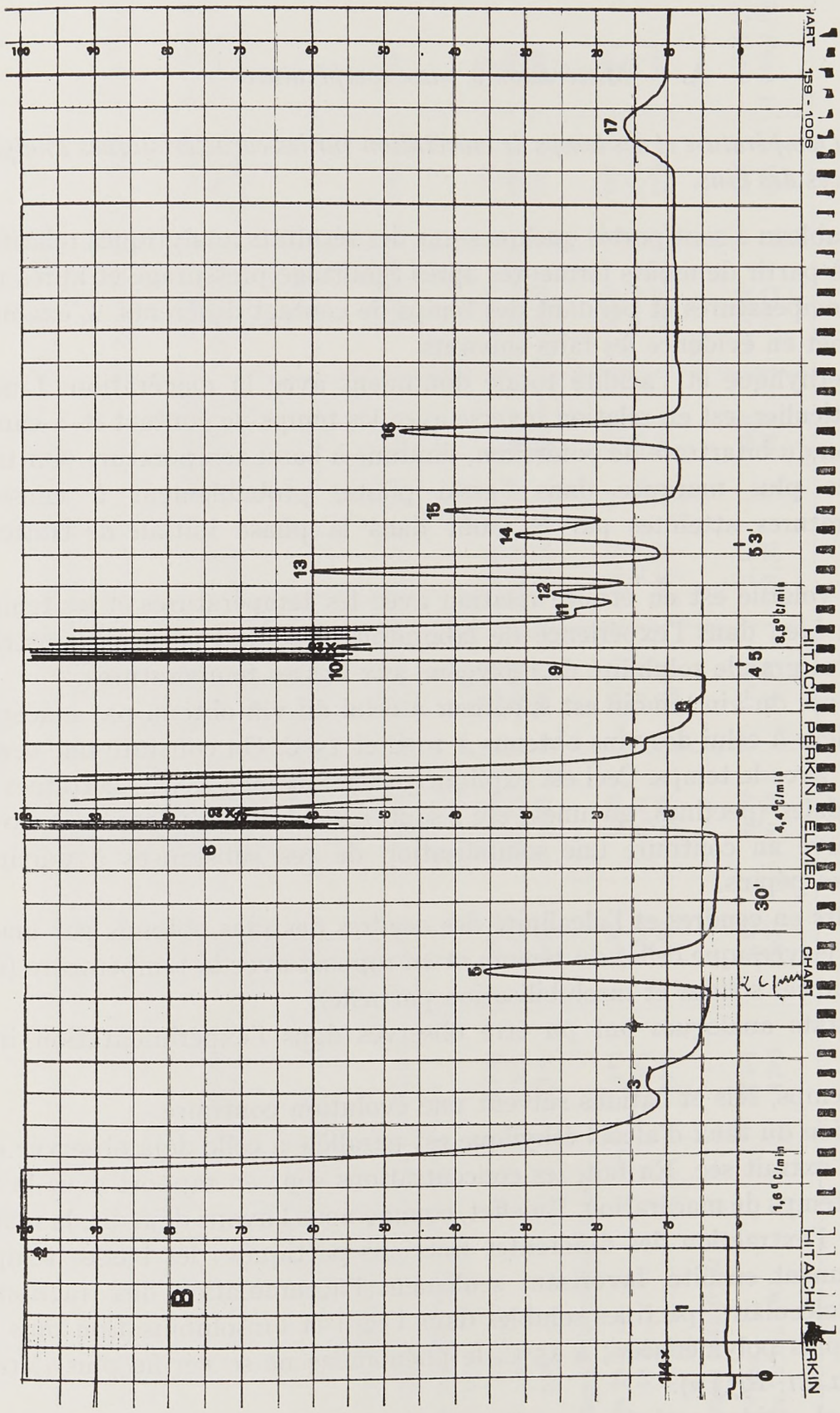


FIG. 1. — *Aromagramme des composés volatils présents dans l'espace de tête du vin blanc obtenu par macération sur marc* (72 h, 5°C) *du cépage* Greco di Todi

III. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

A. — *Macération à basse température*

Influence de la température et des temps de macération sur les caractéristiques analytiques et gustatives des vins.

Dans le tableau 2 sont portés quelques-uns des résultats analytiques relatifs aux vins obtenus à partir de moûts fermentés après égouttage-pressurage et après macération à des températures et pendant des temps de contact différents. L'examen de ces données met en évidence les faits suivants.

L'alcool éthylique et l'acidité totale diminuent avec la macération. L'acidité totale, en particulier, est en relation inverse avec les temps de contact et, à cause de la précipitation du bitartrate de potassium, diminue à basse température. On trouve une différence plus marquée dans l'essai pilote, probablement à cause des basses températures atteintes par le moût dans la phase initiale de traitement (2°C).

L'acidité volatile est en étroite relation avec les températures et les temps de contact, aussi bien dans l'expérience de laboratoire que dans l'essai industriel, à cause de la plus grande solubilité de l'oxygène aux basses températures.

L'extrait sec du vin témoin est supérieur à celui du vin obtenu par macération à 5°C et inférieur à celui des vins obtenus à 10°C et 15°C. On constate une certaine augmentation avec le temps. Ceci est expliqué par le fait que, à 5°C, certaines substances colloïdales (pectines, gommes, etc.) sont insolubilisées, alors qu'à 10°C et 15°C on observe au contraire une solubilisation de ces substances à partir des pellicules et des pépins.

Les teneurs en cendres et l'alcalinité des cendres des vins obtenus par macération sont plus élevées que celles du témoin et en rapport avec la température (diffusion des substances solides et insolubilisation partielle).

Des résultats analogues ont pu être observés dans l'expérimentation industrielle.

Avec le temps, sels et cations suivent une évolution contraire.

La variation du taux d'alcool éthylique est parallèle à celle déjà observée en ce qui concerne l'extrait sec. En fait, les concentrations sont en rapport avec la température et le temps de macération. En effet, comme nous l'avons déjà dit, la macération provoque l'extraction des différentes fractions pectiques ; les basses températures interviennent ensuite, favorisant seulement l'accumulation des fractions de faible poids moléculaire (pectines solubles dans l'eau) et l'insolubilisation puis l'élimination des plus polymérisées ; à 15°C, le phénomène ne se vérifie plus (MONTEDORO et ANGELINI, 1973 *a*).

Azote total, acides aminés et proline sont davantage présents dans les vins obtenus par macération, vraisemblablement à cause de la cession de ces substances par les parties solides, en premier lieu les pellicules (FANTOZZI et MONTEDORO, 1973 *b*).

TABLEAU 2

Analyses des vins blancs obtenus à partir de moûts fermentés après macération sur le marc à des températures et des temps de contact différents

	Degré alcool.	Acidité totale acide tartrique (g/l)	Acidité volatile acide acétique (g/l)	Extrait sec (g/l)	Cendres (g/l)	Alcalinité cendres (méq./l)	Alcool méthylique (mg/l)	Azote total (mg/l)	Ac. aminés totaux (1) (mg/l)	Proline (2) (mg/l)
Essais de laboratoire										
Témoin (vin. class.)	11°6	5,70	0,58	18,60	1,12	15,8	58,8	425	170	725
Influence de la température après 72 h										
Macération à 5°C	11°5	5,00	0,68	16,78	1,14	—	52,0	450	760	733
10°C	11°5	5,10	0,78	19,80	1,18	16,0	66,4	490	390	750
15°C	11°5	5,30	0,87	20,49	1,28	16,5	63,2	710	240	783
Influence du temps de contact à 10°C :										
après 24 h	11°5	5,32	0,68	18,80	1,12	16,5	51,9	560	260	700
— 48 h	11°4	5,10	0,77	19,20	1,16	16,3	56,6	470	295	715
— 72 h	11°5	5,10	0,78	19,80	1,18	16,0	66,4	490	390	750
Essais industriels										
Témoin (vin. class.)	13°1	7,12	0,29	18,60	1,17	13,0	22,1	220	867,9 (3)	—
Macération de 72 h à 5°C	12°6	5,77	0,49	16,73	1,35	13,7	20,2	244	1 110,8 (3)	—

(1) Dosage colorimétrique (Moore et Stein, 1948).
(2) Dosage colorimétrique (Ough, 1969).
(3) Dosage par chromatographie en phase gazeuse (Fantozzi et Montedoro, 1973 *a*).

Dans le tableau 3 ont été inscrites les variations quantitatives des acides aminés libres déterminés par chromatographie en phase gazeuse, et l'azote total des vins obtenus à partir des moûts fermentés immédiatement après égouttage-pressurage et par macération de 72 heures à 5°C. On constate de sensibles augmentations de concentration, de la proline surtout, et ensuite de la valine, de la glycine, de l'acide glutamique et de la lysine, alors qu'on note une diminution de l'alanine, de la leucine et surtout de la phénylalanine et de l'arginine. Ces variations pourraient être liées aux différentes affinités de ces substances pour les polyphénols et au métabolisme des levures. Dans une note précédente (FANTOZZI et MONTEDORO, 1973 *a*), nous avons observé que la composition initiale du moût, en ce qui concerne les substances azotées, subit une autre évolution : l'alanine et l'arginine diminuent dans les vins issus de moûts d'égouttage et augmentent dans ceux élaborés à partir de moûts de presse.

TABLEAU 3

Composition en acides aminés des vins blancs obtenus à partir de moûts fermentés par vinification classique et après macération sur marcs pendant 72 h à 5°C

(essai pilote)

	Vinif. class. (mg/l)	Macération à froid (mg/l)
Azote total	220	244
Acides aminés [1]		
Alanine	16,5	10,1
Valine	7,7	10,7
Ac. γ-amino-butyrique	132,8	135,0
Leucine	55,5	18,0
Isoleucine	—	2,6
Glycine	9,7	27,0
Proline	468,6	850,0
Sérine	2,8	6,1
Thréonine	3,2	3,5
Hydroxyproline	—	—
Ac. aspartique	3,0	8,8
Méthionine	traces	traces
Cystéine	5,6	4,6
Ac. glutamique	13,0	24,8
Phénylalanine	88,5	—
Arginine	22,4	—
Lysine	—	9,6
Tyrosine	38,6	—
Histidine	—	—
Tryptophane	—	—
Cystine	—	—
Total des acides aminés	867,9	1 110,8

[1] Dosage par chromatographie en phase gazeuse (FANTOZZI et MONTEDORO, 1973 *a*).

Composés volatils.

Les vins obtenus dans l'essai pilote ont été examinés. Dans le tableau 4 sont récapitulés les résultats relatifs soit à la distribution en pourcentage des composés volatils présents dans l'espace de tête par rapport au propanol égalé à 100, soit au rapport de la somme des surfaces relatives aux alcools supérieurs sur celles relatives aux esters. De l'ensemble des données, on peut constater que les vins obtenus par macération sont plus riches en tous les composés volatils examinés. Un accroissement visible est observé en faveur de l'acétate d'éthyle dont les valeurs sont indiquées entre parenthèses (la séparation entre celui-ci et l'isobutanol était effectuée à l'aide d'une colonne de 3 mètres). Le rapport de la somme des alcools supérieurs aux esters met clairement en évidence l'accumulation de ces derniers sous l'effet de la macération.

TABLEAU 4

Distribution en pourcentage (par rapport au propanol) *de quelques composés volatils présents dans l'* « *espace de tête* » *des vins obtenus à partir de moûts fermentés par vinification classique et après macération sur marc pendant 72 h à 5°C*

(essai pilote)

	Vinif. class.	Macération à froid
1. Méthanol	traces	traces
2. Éthanol	nc	nc
3. Isopropanol	345	traces
4. Formiate d'éthyle	traces	traces
5. *n*-Propanol	100	100
6. Acétate d'éthyle + isobutanol [1]	2 071 (1 760)	5 161 (4 542)
10. Méthyl-3-butanol 1 + méthyl-2-butanol 1	1 984	2 903
11. Inconnu	traces	traces
12. Inconnu	6	12
13. *n*-Hexanal + lactate d'éthyle	21	65
14. Butyrate d'éthyle	22	60
15. Acétate d'isoamyle	23	52
16. Caproate d'éthyle	47	91
17. Phényl-2-éthanol	26	51
Σ surf. alcools sup. / Σ surf. esters neutres	1,25	0,91

[1] Les chiffres entre parenthèses sont relatifs à l'acétate d'éthyle.
nc : non calculé.

Composition phénolique, activité PPO des moûts, stabilité à l'oxydation des vins correspondants.

Les résultats analytiques relatifs à l'activité polyphénoloxydasique et à quelques fractions phénoliques présentes dans les moûts et responsables de l'instabilité à l'oxydation des vins (Peri *et al.*, 1971) sont réunis dans le tableau 5.

La macération à 5°C, aussi bien au laboratoire que dans l'essai industriel, entraîne une diminution des polyphénols totaux, des tanins, des flavonoïdes totaux. Au laboratoire, le taux de leucoanthocyanes diminue mais il ne varie pas dans l'essai pilote. Seule à cette température la teneur en catéchines augmente. La macération à 10°C et 15°C provoque une augmentation des composés phénoliques, sauf pour les leucoanthocyanes dans le cas de la macération à 10°C.

TABLEAU 5

Teneur en polyphénols et activité PPO des moûts obtenus par macération à différentes températures sur le marc

	Polyphénols						Activité PPO (1) (mg/l)
	Totaux (mg/l)	Tannins (mg/l)	Flav. tot. (mg/l)	Catéch. (mg/l)	Leuco-anth. (mg/l)	V/L	
Essais de laboratoire							
Témoin (vin. class.)	754	629	664	76	380	0,20	31,5
Influence de la temp. après 72 h :							
macération à 5°C	730	580	627	96	320	0,30	30,8
10°C	914	706	771	205	370	0,55	32,0
15°C	1 036	761	818	250	507	0,49	34,0
Essai industriel							
Témoin(vin. class.).....	1 125	963	990	180	1 030	0,17	27,0
Macération 72 h à 5°C	1 060	735	910	420	1 035	0,40	14,2

(1) Exprimé en mg/l de purpurogalline (MONTEDORO, 1969).
V/L : catéchines/leucoanthocyanes.

La macération à basse température favorise la solubilisation des fractions phénoliques les moins polymérisées présentes dans les pellicules ; on peut le vérifier par les rapports V/L des moûts obtenus après l'égouttage-pressurage et par macération à 5°C et 10°C, par la diminution des polyphénols tanins à 5°C par rapport au témoin et par la légère augmentation de cette fraction à 10°C et 15°C.

Il est intéressant d'observer comment, après trois jours de macération à 5°C (essai industriel), l'activité polyphénoloxydasique est réduite d'environ 50 p. 100, vraisemblablement par suite de la combinaison de la protéine enzymatique avec les tanins.

Les résultats analytiques relatifs à la composition phénolique et à la stabilité de la couleur des vins sont rapportés dans le tableau 6. Ces données mettent surtout en évidence l'influence de la macération sur la composition polyphénolique et la couleur des différents vins par rapport au témoin, accentuant les différences entre ceux-ci. On assiste en effet à un enrichissement préférentiel en catéchines et en leucoanthocyanes par rapport aux flavonoïdes condensés, ce qui est démontré par

TABLEAU 6

Teneur en polyphénols et stabilité à l'oxydation des vins blancs obtenus à partir de moûts par macération à des températures et des temps de contact différents sur le marc et, séparément, sur les pellicules et les pépins

	Polyphénols						rH	Couleur DO à 450 nm × 1 000		
	Tot. (mg/l)	Tann. (mg/l)	Flav. tot. (mg/l)	Catéch. (mg/l)	Leucoanth. (mg/l)	V/L		Init.	Exp. à l'air test cas. oxyd.	Exp. à l'étuve à 50°C test madérisation
Essais de laboratoire										
Témoin (vin. class.)	202	16	21	62	100	0,62	25,84	135	140	190
a) Influence de la température après 72 h :										
macération à 5°C	234	54	68	110	95	1,15	26,74	90	160	252
10°C	319	111	148	225	217	1,09	26,65	103	165	415
15°C	399	144	209	320	305	1,04	24,72	135	215	495
b) Influence du temps de contact à 10°C :										
après 24 h	262	54	87	150	107	1,40	27,05	98	200	240
48 h	289	78	112	185	167	1,10	26,75	97	190	325
72 h	319	111	148	225	217	1,09	26,65	103	165	415
c) Influence des parties solides après macération de 72 h à 10°C :										
sur pellicules	304	103	133	215	230	0,93	—	112	150	345
sur pépins	204	13	45	50	12	4,16	—	70	225	190
Essais industriels										
Témoin (vin. class.)	374	173	193	120	217	0,55	—	165	192	250
Macération de 72 h à 5°C	434	214	266	600	477	1,25	—	225	255	305

V/L : catéchines/leucoanthocyanes.

une augmentation des valeurs du rapport V/L. La présence d'alcool éthylique d'une part provoque l'élimination des fractions tanniques et de l'autre favorise la solubilisation des flavonoïdes moins polymérisés.

Les pellicules et les pépins participent au phénomène de façon opposée. Les pellicules cèdent une plus grande quantité de polyphénols que les pépins, ces derniers produisent en pourcentage une plus grande quantité de phénols moins polymérisés (le rapport V/L est beaucoup plus élevé par rapport aux pellicules) conformément aux résultats obtenus par Peri et Pompei (1972).

La stabilité du vin à l'oxydation est conditionnée par la présence des flavonoïdes et parmi eux des moins polymérisés (Rossi et Singleton, 1966 ; Peri *et al.*, 1971).

Dans le même tableau 6, on observe que les vins obtenus par macération sont moins stables à l'oxydation ; parmi ceux-ci, les vins obtenus par macération à 5°C se révèlent les plus stables. Les vins obtenus à 10°C présentent une certaine résistance à l'oxydation à froid, alors que la stabilité à l'oxydation à chaud semble limitée.

L'observation de l'influence des temps de macération sur la stabilité à froid offre un intérêt particulier. Les vins provenant de moûts macérés plus longtemps sont plus stables, probablement à cause de la présence de réductones et de la perte d'activité polyphénoloxydasique (Montedoro, 1969).

Effets de la centrifugation du moût.

TABLEAU 7

Influence de la centrifugation du moût obtenu par macération de 72 h à 10°C sur la composition phénolique, l'activité PPO et la stabilité à l'oxydation du vin

	Polyphénols						Activ. PPO (2)	Couleur DO à 450 nm × 1 000		
	Tot. (mg/l)	Tann. (mg/l)	Flav. tot. (mg/l)	Catéch. (mg/l)	Leuco-anth. (mg/l)	V/L		init.	exp. à l'air test casse oxydasique	exp. à l'étuve à 50°C, test madérisation
Essai de laboratoire										
Témoin (vin. class.)	202 (754)	16 (629)	21 (664)	62 (76)	100 (380)	0,62 (0,20)	— (31,5)	135 —	140	190
Macération de 72 h à 10°C .	319 (914)	111 (706)	148 (771)	225 (205)	217 (370)	1,09 (0,55)	— (32,0)	103 —	165	415
Id. + centrifugation	235 (340)	27 (108)	45 (169)	78 (90)	187 (270)	0,41 (0,33)	— (0,6)	148 —	190	250

(1) Les chiffres entre parenthèses sont relatifs au moût.
(2) Exprimé en mg/l de purpurogalline (Montedoro, 1969).
V/L : catéchines/leucoanthocyanes.

Afin d'obtenir une plus grande stabilité à l'oxydation des vins issus de la macération, on a soumis le moût à une centrifugation avant fermentation.

Certains auteurs (Oparine, 1963 ; Poux, 1966) avaient déjà mis en évidence que la centrifugation du moût, en réduisant la concentration en PPO, provoquait une plus grande stabilité à l'oxydation du vin correspondant.

Comme on l'a déjà dit, une partie du moût égoutté après macération de 72 heures à 10°C a été centrifugée et a ensuite fermenté dans les conditions décrites. Les résultats analytiques correspondants, rapportés dans les tableaux 7, 8 et 9, mettent en évidence les effets de cette technique, aussi bien sur les différents composés phénoliques non tanniques (le rapport V/L passe de 1,09 à 0,41) que sur les substances protéiques dont l'élimination, en plus de la réduction de l'activité polyphénoloxydasique (Poux, 1966), provoque une nette diminution de la concentration en catéchines.

TABLEAU 8

Influence de la centrifugation sur la composition des acides aminés des vins obtenus par vinification en blanc à partir des moûts fermentés après macération sur les marcs pendant 72 h à 5°C

(essai de laboratoire)

	Témoin (mg/l)	Après centrifugation (mg/l)
Azote total	490	425
Acides aminés [1] :		
Alanine	19,3	38,6
Valine	6,1	13,8
Ac. γ-amino-butyrique	117,5	92,5
Leucine	39,6	traces
Isoleucine	1,7	4,1
Glycine	15,1	15,1
Proline	748,0	494,0
Sérine	7,2	9,3
Thréonine	4,0	5,4
Hydroxyproline	—	—
Ac. aspartique	62,7	57,6
Méthionine	5,0	1,7
Cystéine	6,6	2,3
Ac. glutamique	42,7	45,0
Phénylalanine	9,2	12,6
Arginine	339,8	593,5
Lysine	—	—
Tyrosine	—	—
Histidine	—	—
Tryptophane	—	—
Cystine	—	—
Total des acides aminés	1 424,5	1 388,7

[1] Dosage par chromatographie en phase gazeuse (Fantozzi et Montedoro, 1973 *a*).

TABLEAU 9

Influence de la centrifugation du moût obtenu par macération sur marc (72 h à 10°C) *sur la distribution en pourcentage* (par rapport au propanol) *de quelques composés volatils présents dans l' « espace de tête » des vins correspondants*

(essai de laboratoire)

	Témoin	Après centrifugation
1. Méthanol	traces	10
2. Éthanol	nc	nc
3. Isopropanol	traces	18
4. Formiate d'éthyle	traces	17
5. Propanol	100	100
6. Acétate d'éthyle + isobutanol (1)	4 830 (4 080)	8 404 (5 720)
10. Méthyl-3-butanol 1 + méthyl-2-butanol	2 780	1 289
11. Inconnu	traces	traces
12. Inconnu	14	16
13. *n*-Hexanal + lactate d'éthyle	68	47
14. Butyrate d'éthyle	59	26
15. Acétate d'isoamyle	53	70
16. Caproate d'éthyle	100	58
17. Phényl-2-éthanol	53	30
$\frac{\Sigma \text{ surfaces alcool sup.}}{\Sigma \text{ surfaces esters neutres}}$	0,82	0,62

(1) Les chiffres entre parenthèses sont relatifs à l'acétate d'éthyle.
nc : non calculé.

On observe aussi d'importantes variations des acides aminés (tabl. 8) alors que les composés volatils ne subissent que de légères modifications (tabl. 9). Ces effets, même s'ils produisent une légère augmentation de la couleur initiale du vin, se traduisent ensuite par une évidente stabilité à l'oxydation à froid et à chaud.

B. — *Macération carbonique*

Comme nous l'avons déjà dit, nous nous sommes limités à rapporter dans cet article les données analytiques d'intérêt technique. En effet, nous avons observé que les différents cépages présentaient une certaine variabilité dans leur rhéologie et leur composition chimique, liée à leurs caractéristiques génétiques (MONTEDORO et ANGELINI, 1973 *a*).

L'examen global de tous les résultats analytiques a mis en évidence que 3 jours de macération sont plus que suffisants, pour le *Greco di Todi*, pour obtenir une nette amélioration des caractéristiques organoleptiques des vins obtenus, alors que des temps plus longs peuvent être prévus pour le *Trebbiano*. Nous avons donc jugé opportun de limiter la liste des résultats aux vins provenant de raisins ayant macéré pendant 3 jours.

Influence de la macération carbonique sur les caractéristiques analytiques, l'activité PPO et la stabilité des vins à l'oxydation.

Si on compare les données du tableau 10 relatives aux vins obtenus par vinification traditionnelle à celles des vins obtenus par macération carbonique, on peut constater que ces derniers présentent des caractéristiques analytiques qui, pour plusieurs groupes de composés examinés, sont différentes.

TABLEAU 10

Caractéristiques analytiques, activité PPO et stabilité à l'oxydation des vins blancs obtenus par macération carbonique

(Greco di Todi *et* Trebbiano toscano)

Analyses	*Greco di Todi*		*Trebbiano toscano*	
	Vinification classique	Macération carbonique	Vinification classique	Macération carbonique
Degré alcoolique	13°10	13°20	11°70	12°10
Ac. totale (ac. tartrique g/l)	7,1	5,7	6,9	5,5
Ac. fixe (ac. tartrique g/l)	6,8	5,2	6,2	4,9
Ac. volatile (ac. acétique g/l)	0,3	0,4	0,6	0,6
pH	2,94	3,26	2,99	3,30
rH	21,3	21,4	20,8	20,8
Azote total (mg/l)	220	452	256	304
Acides aminés totaux (mg/l)	500	790	630	—
Proline (mg/l)	967	783	800	—
Extrait sec (g/l)	18,6	17,4	16,7	17,1
Cendres (g/l)	1,1	1,3	1,1	1,4
Alcalinité cendres (méq./l)	13	14	13,2	15
Alcool méthylique (mg/l)	22,1	14,2	23,4	20,3
Fer (mg/l)	4,3	2,9	3,9	4,1
Polyphénols totaux (mg/l)	374	540	246	276
Polyphénols tanins (mg/l)	163	280	50	71
Flavonoïdes totaux (mg/l)	193	344	69	71
Catéchines (mg/l)	120	450	100	150
Leucoanthocyanes (mg/l)	217	650	110	130
V/L	0,55	0,69	0,91	1,15
Couleur DO à 450 nm × 1 000 :				
initiale	165	257	107	185
à l'air (casse oxydasique)	192	290	120	215
à l'étuve 50°C (madérisation)	250	440	132	245

V/L : catéchines/leucoanthocyanes.

L'acidité totale et l'acidité fixe présentent en général des valeurs inférieures. Les valeurs du pH sont en accord avec l'évolution de ces constituants. L'acidité volatile ne présente pas de variations dignes de remarque.

Les composés azotés, en ce qui concerne le *Greco di Todi*, ont des teneurs plus élevées, à l'exception de la proline qui décroît.

Certains auteurs (BERGERET et FEUILLAT, 1971) ont noté une variation analogue pour les vins rouges, tandis qu'une évolution contraire a été observée pour les vins blancs (BENARD *et al.*, 1971).

L'extrait sec, alors qu'il diminue pour le *Greco di Todi*, augmente pour le *Trebbiano*, vraisemblablement à cause des différences de structures parenchymatiques caractéristiques de ces deux cépages (MONTEDORO et ANGELINI, 1973 *a*).

Les cendres et l'alcalinité des cendres sont plus élevées. Ce comportement est en relation avec ce que nous avons dit ci-dessus à propos de l'évaluation des substances pectiques, en considérant le fait que, à cause de celles-ci, d'autres substances telles que les sels minéraux peuvent passer en solution (MONTEDORO et ANGELINI, 1973 *b*).

Le fer se trouve dans les vins à concentration très basse. Son évolution est en relation avec la structure des deux cépages, comme l'ont signalé d'autres auteurs (BENARD *et al.*, 1971).

On a mis en évidence une augmentation des concentrations des différentes fractions phénoliques. On observe, en ce qui concerne le *Greco di Todi*, des augmentations sensibles des flavonoïdes totaux, des catéchines et des leucoanthocyanes. L'augmentation est plus modérée pour le *Trebbiano*. Ces résultats, en accord avec ceux obtenus par nous et d'autres auteurs pour les vins blancs et rouges (BOURZEIX, 1971 ; FANTOZZI et MONTEDORO, 1971), montrent que la stabilité des vins obtenus par macération dépend de la structure et de la composition du fruit, variables avec les caractères génétiques des différents cépages. En fait, alors qu'on observe une diminution nette de la stabilité à l'oxydation dans les essais de macération pour le *Greco di Todi*, on obtient des vins suffisamment stables pour le *Trebbiano*, vraisemblablement à cause du taux différent des fractions flavonoïdes moins condensées (catéchines).

Acides organiques et acides-phénols.

Nous présentons quelques résultats obtenus au cours d'une expérimentation précédente (FANTOZZI et MONTEDORO, 1972). Les résultats récapitulés dans le tableau 11 mettent en évidence, dans le cas du vin de macération carbonique, une teneur en acide lactique très inférieure à celle du vin obtenu par vinification classique. Une partie de l'acide malique a donc disparu pendant la phase de macération carbonique.

On observe une augmentation de l'acide succinique.

Tous les acides-phénols, parallèlement aux autres fractions phénoliques, présentent une augmentation que l'on peut attribuer à l'accroissement de la perméabilité des parois cellulaires, qui provoque une plus grande libération des polyphénols de la pellicule. Les acides férulique, caféique et hydroxycaféique, en particulier, ont le pourcentage d'augmentation le plus élevé, à cause de la macération.

Composés volatils.

Dans le tableau 12 ont été récapitulés les résultats analytiques relatifs aux pourcentages des différents constituants par rapport au propanol égalé à 100. On note ainsi que les vins obtenus par macération du *Greco di Todi* ont des teneurs plus basses en alcools supérieurs et un taux plus élevé d'esters, par rapport aux témoins, nos résultats étant en accord avec ceux d'autres auteurs (JOURET et MOUTOUNET, 1970). Les vins issus de la macération du *Trebbiano* présentent un enrichissement progressif en constituants volatils, bien que de façon moins nette.

TABLEAU II

Distribution en pourcentage des acides organiques aliphatiques cycliques et alicycliques, déterminés par chromatographie en phase gazeuse, présents dans des vins blancs obtenus par vinification classique et macération carbonique (1)

	Vinif. class. (2)	Macération carbonique (2)
Ac. tartrique	50,8	48,9
Ac. malique	0,0	0,0
Ac. citrique	0,0	0,0
Ac. lactique	22,9	9,9
Ac. malonique	1,1	4,8
Ac. succinique	6,3	7,3
Ac. coumariques	1,0	1,4
Ac. caféique	8,6	10,4
Ac. hydroxycaféique	0,7	1,1
Ac. férulique	1,6	2,5
Ac. syringique	0,1	0,1
Ac. gallique	0,0	0,0
Ac. protocatéchique + shikimique	0,0	0,1
Ac. quinique	0,1	0,2
Ac. inconnus	6,8	13,3
	100,0	100,0

(1) Dosage effectué après une année de conservation (Fantozzi et Montedoro, 1972).

(2) *Greco di Todi* (30 p. 100) + *Trebbiano toscano* (70 p. 100).

TABLEAU I2

Distribution en pourcentage (par rapport au propanol) *de quelques composés volatils présents dans l' « espace de tête » de vins obtenus par vinification classique et par macération carbonique de 3 jours*

(Greco di Todi *et* Trebbiano toscano)

	Greco di Todi		*Trebbiano toscano*	
	Vinification classique	Macération carbonique (3 jours)	Vinification classique	Macération carbonique (3 jours)
1. Méthanol	traces	traces	53	traces
2. Éthanol	nc	nc	nc	nc
3. Isopropanol	345	17	31	—
4. Formiate d'éthyle	traces	4	8	9
5. *n*-Propanol	100	100	100	100
6. Acétate d'éthyle + isobutanol	2 071	5 079	8 201	3 699
7. Inconnu	traces	traces	traces	traces
8. Inconnu	traces	traces	traces	traces
9. Inconnu	traces	traces	traces	318
10. Méthyl-3-butanol 1 + méthyl-2-butanol 1	1 984	1 500	4 421	1 756
11. Inconnu	traces	traces	traces	traces
12. Inconnu	6	8	16	traces
13. *n*-Hexanal + lactate d'éthyle	21	108	92	221
14. Butyrate d'éthyle	22	traces	19	traces
15. Acétate d'isoamyle	23	48	60	22
16. Caproate d'éthyle	47	127	65	79,5
17. Phényl-2-éthanol	26	107	37	—

nc : non calculé.

IV. — CONCLUSION

Les résultats de cette recherche préliminaire nous permettent de faire les conclusions suivantes.

La macération du moût à basse température conduit à une nette amélioration des caractéristiques qualitatives, mise en évidence par l'augmentation des esters.

Les températures les plus efficaces de macération se situent aux environs de 5°C, puisque déjà à 10°C on constate une diminution de la stabilité à l'oxydation.

Les temps de macération optimaux ne doivent pas dépasser 48 heures, tant pour les caractéristiques organoleptiques que pour la stabilité à l'oxydation.

Une intervention technique possible, destinée à améliorer la stabilité du vin à l'oxydation, peut être recherchée dans la centrifugation du moût.

Le vin de *Greco di Todi* élaboré par macération carbonique, parallèlement à une amélioration de ses caractéristiques organoleptiques, subit une perte de stabilité à l'oxydation. Le vin issu du *Trebbiano* ne subit pas d'amélioration qualitative évidente par ce type de vinification qui toutefois n'en compromet pas la stabilité à l'oxydation.

Cependant les résultats de ce travail suggèrent qu'une amélioration qualitative du produit peut être obtenue soit par vinification par macération carbonique, soit par macération à basse température. Cette dernière solution ne pourra être adoptée qu'après une étude sur les effets d'une plus basse température de macération, de l'intensité du pressurage, de la présence de la totalité ou d'une partie du marc, du froid en cours de fermentation (Gervasi, 1961 ; Ough et Amerine, 1966). Il faudra également vérifier la validité de l'application de la méthode à d'autres cépages.

Reçu pour publication en mars 1974.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr G. Lungarotti, propriétaire de la « Cantine Lungarotti » pour l'aide précieuse qu'il nous a apportée au cours de nos travaux.

SUMMARY

WINE-MAKING FROM WHITE GRAPES BY MACERATION AT LOW TEMPERATURE AND BY CARBONIC MACERATION

The respective influences of different systems of white wine-making were examined on the quality of wine : maceration of must on the pomace at low temperature, maceration under anaerobic conditions (carbonic maceration).

For what concerns the first system of vinification, we have examined the effects of different times (24, 48, 72 h) and temperatures (5°, 10°, 15°C) of maceration and the effects of centrifugation of the must after maceration.

The maceration of the must during 48 h at 5°C induces a marked improvement of the quality of the wine by the increase of the esters.

The stability to oxidative browning of the wine, partially reduced by this wine-making system, is improved by the centrifugation of the must before fermentation;

With regard to the carbonic maceration, we have reported some of the most important analytical results of the optimum time of maceration of the two varieties of white grapes growing in the middle Italy, *Greco di Todi* and *Trebbiano toscano*.

The *Greco di Todi* wine shows an improvement of the quality and a loss of the stability to oxidative browning, while the *Trebbiano toscano* wine presents a sufficient stability to oxidative browning, but no improvement of the quality.

RESUMEN

ENSAYOS DE VINIFICATION DE UVA BLANCA CON MACERACION A BAJA TEMPERATURA Y MACERACION CARBONICA

Se ha procedido al examen de algunas técnicas de vinificación con miras a la mejora de la producción de vinos blancos, y entre otras, la maceración del mosto a baja temperatura y la maceración carbónica.

Por lo que respecta a la maceración a baja temperatura, se ha estudiado la influencia del tiempo de contacto (24, 48 y 72 horas), de la temperatura (5°, 10° y 15°C) y de la centrifugación del mosto después de maceración.

La maceración del mosto a 5°C durante 48 horas conduce a una resuelta mejora de las características cualitativas por aumento de los esteres.

La centrifugación del mosto después de maceración mejora, a su vez, la estabilidad a la oxidación del vino correspondiente.

Por lo que respecta a la maceración carbónica, se da cuenta de algunos de los resultados más sobresalientes relativos a las duracione óptimas de maceración para dos cepas de uva blanca, que corresponden a las más cultivadas en Italia central, es decir, las variedades *Greco di Todi* y *Trebbiano toscano*. El vino de *Greco di Todi*, sufre una pérdida de estabilidad a la oxidación, al mismo tiempo que se produce una mejora de las características cualitativas. Por el contrario, el vino de *Trebbiano toscano* no acusa ninguna mejora evidente de la calidad ni pérdida de estabilidad a la oxidación.

RIASSUNTO

ESPERIENZE DI VINIFICAZIONE DI UVE BIANCHE CON MACERAZIONE A BASSA TEMPERATURA E MACERAZIONE CARBONICA.

Sono esaminati alcuni sistemi di vinificazione per il miglioramento della produzione dei vini bianchi, qulai la macerazione del mosto a bassa temperatura e la macerazione carbonica.

Per quanto concerne la macerazione a bassa temperatura, sono presi in considerazione diversi tempi di contatto (24, 48, 72 h), diverse temperature (5°, 10°, 15°C) e gli effetti della centrifugazione del mosto dopo macerazione.

La macerazione del mosto per 48 h a 5°C conduce ad un netto miglioramento delle caratteristiche qualitative per aumento degli esteri. La stabilità all'ossidazione del vino, in parte compromessa con questa tecnica di vinificazione, è migliorata mediante la centrifugazione del mosto prima della fermertazione.

A riguardo della macerazione carbonica sono riportati alcuni dei risultati più importanti, relativi ai tempi di macerazione per due cultivars di uve bianche diffusamente coltivate nell' Italia centrale *Greco di Todi* e *Trebbiano toscano*.

Il vino di *Greco di Todi* consegue un miglioramento delle caratteristiche qualitative ma subisce una perdita di stabilita all'ossidaizone.

Per contro il vino di *Trebbiano toscano* non ecquisisce un miglioramento evidente della qualità né una perdita della stabilita all'ossidazione.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AUBERT S., POUX C., 1969. Extraction des composés phénoliques du raisin. II. Taux de passage dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 111.

A. O. A. C., 1968. *Official methods of analysis*, W. Horwitz, Washington.

BENARD P., 1971. Vinification du *Grenache* par macération carbonique. *Journées Macérat. carb. I. N. R. A.*, Avignon 10-11 février.

BENARD P., BOURZEIX M., BURET M., FLANZY C., MOURGUES J., 1971. Méthode de vinification par macération carbonique. VI. Élaboration des vins blancs sec. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 199.

BERG H. W., AKIYOSHI M., 1956. The effect of contact time of juice with pomace on the color and tannin content of red wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **7**, 84.

BERG H. W., AKIYOSHI M., 1958. Further studies of the factors affecting the extraction of color and tannin from red grapes. *Food Res.*, **23**, 511.

BERGERET J., FEUILLAT M., KAMAL S., 1971. Recherches sur la vinification par « macération carbonique » ; expérimentation sur le *Gamay* en Côte d'Or (1970). *Journées Macérat. carb. I. N. R. A.*, Avignon 10-11 février.

BERTUCCIOLI M., MONTEDORO G., 1973. Determination of volatile components of alcoholic beverages. I. Analyses of the « head space ». *J. Sci. Food. Agric.* (sous presse).

BOURZEIX M., 1971. Évolution des polyphénols des raisins au cours de la fermentation intracellulaire. *Journées Macérat. carb. I. N. R. A.*, Avignon 10-11 février.

BRUGIRARD A., TAVERNIER J., 1952. Les matières tannoïdes dans les cidres et les poirés. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 311.

FANTOZZI P., 1971. *Contribution à l'étude par chromatographie en phase gazeuse des constituants acides et neutres de quelques vins. Influence des levures et des conditions du milieu.* Thèse 3e cycle d'Ens. Sup I. B. A. N. A., Dijon.

FANTOZZI P., MONTEDORO G., 1971. Résultats de quelques essais de vinification avec macération carbonique de raisins blancs. *Journées Macérat. carb. I. N. R. A.*, Avignon 10-11 février.

FANTOZZI P., MONTEDORO G., 1972. Applicazione di un metodo gascromatografico allo studio della composizione in acidi organici mono e polibasici non chetonici non volatili, presenti in vini ottenuti in diverse condizioni di vinificazione. *Sci. Tecnol. Alim.*, **5**, 283.

FANTOZZI P., MONTEDORO G., 1973 *a*. Determination of the free amino acids in musts and wines by gas liquid chromatography. *Amer. J. Enol. Vitic.* (sous presse).

FANTOZZI P., MONTEDORO G., 1973 *b*. Effetti della pressione ed influenza delle parti costitutive del grappolo d'uva sulla composizione azotata dei mosti e dei corrispondenti vini bianchi. *Ann. Fac. Agraria*, Perugia (sous presse).

GERVASI E., 1961. Il freddo in enologia. *Genio rurale*, **24**, 1.

JOURET J., MOUTONNET M., 1970. Comparaison des substances volatiles émises au cours de la vinification de raisins foulés et non foulés. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 59.

KLIEWER W. M., 1970. Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *J. Food. Sci.*, **35**, 17.

KOROTKEVICH A. V., GAIVORONSKAYA Z. I., KRAVCHENKO A. P., 1950. *Tannidnye zapasy vinogradnoi yagadoy i usloviya perekhoda ikh vino. Biokhim. Vinodeliya, Akad. Nauk S. S. S. R. Sbornik*, **3**, 26.

KRAMLING T. E., SINGLETON V. L., 1969. An estimate of the non flavonoid phenols in wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **20**, 86.

M. A. F., 1958. *Metodi officiali di analisi per i mosti, i vini e gli aceti.* Ist. Poligrafico dello Stato, Roma.

MONTEDORO G., 1968. L'attività pectolitica di uva di diverse cultivars. Distribuzione dell'enzima e sua caratterizzazione. *Ann. Fac. Agraria*, Perugia, **23**, 585.

MONTEDORO G., 1969. Ricerche sulla polifenolossidasi della uve. II. Estrazione, purificazione e caratterizzazione dell' enzima. *Ind. agr.*, **7**, 259.

MONTEDORO G., ANGELINI L., 1973 *a*. Ricerche sui costituenti metilati e sulla pectin-pectil-idrolasi delle uve e loro ruolo nella genesi dell'alcool metilico nei vini. I. Distribuzione nelle parti costitutive del grappolo di uve di diverse cultivars. *Sci. Tecnol. alim.*, **3**, 159.

MONTEDORO G., ANGELINI L., 1973 *b*. Ricerche sui costituenti metilati e sulla pectin-pectil-idrolasi delle uve e loro ruolo nella genesi dell'alcool metilico nei vini. II. Influenza delle pectine e dei polifenoli in relazione ad alcune operazioni enologiche e a trattamenti chimici e termici alle uve e ai mosti volti a ridurre l'attività pectin-pectil-idrolasica. *Sci. Tecnol. alim.*, **3**, 305.

MOORE S., STEIN W. M., 1948. Photometric method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.*, **176**, 367.

NIKANDROVA V. N., 1957. Diffusion of tannin and coloring substances during processing of grapes. *Sadovostvo, Vinogradarstvo i Vinodelie Moldavii*, **12**, 47. (in *Chem. Abst.* **51**, 18461).

Oparine A. I., 1963. Biochimie du vin. *Bull. Offic. intern. Vigne Vin*, **36**, 1301.

Ough C. S., 1969. Rapide determination of proline in grapes and wines. *J. Food. Sci.*, **34**, 228.

Ough C. S., Amerine M. A., 1961. Studies on controlled fermentation. V. Effects on color, composition and quality of red wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **12**, 9.

Ough C. S., Amerine M. A., 1966. Effect of temperature on wine making. *Bull. California Agric. Exp. Station*, (827), oct.

Peri C., Pompei C., Montedoro G., Cantarelli C., 1971. Maderization of white wines. I. Influence of pressing on the susceptibility of the grapes to oxidative browning. *J. Sci. Food. Agric.*, **22**, 24.

Peri C., Pompei C., 1972. Estrazione e frazionamento dei fenoli delle uve bianche. *Riv. Vitic. Enol.*, **25**, 311.

Pompei C., Peri C., 1971. Determination of catechins in wines. *Vitis*, **9**, 312.

Pompei C., Peri C., Montedoro G., 1971. Le dosage des leucoanthocyanes dans les vins blancs. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 21.

Poux C., 1966. Polyphénoloxydase dans le raisin. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 149.

Rossi J. A. Jr, Singleton V. L., 1966. Contributions of grape phenols to oxygen absorption and browning of wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **17**, 231.

Ruiz-Hernandez M., 1971. Expériences et considérations sur les vins blancs produits par fermentation de raisins entiers. *Journées Macérat. carb. I. N. R. A.*, Avignon 10-11 février.

Shijo N., Muraki H., Tada S., 1959. Skin fermentation of grapes. I. Skin fermentation in red wine making. *Yamanashi Daigaku Hakkô Kenkyûsho Kenkyû Hôkoku*, **6**, 37; (in *Chem. Abst.*, **55**, 12759).

Singleton V. L., Draper D. E., 1964. The transfer of polyphenolic compounds from grape seeds into wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **15**, 34.

Singleton V. L., Sullivan A. R., Kramer C., 1971. An analysis of wine to indicate ageing in wood or treatment with wood chips or tannic acid. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **22**, 161.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 97-111.

MISE AU POINT

LA DEMANDE BIOCHIMIQUE EN OXYGÈNE. DÉTERMINATION ET VALEUR DE LA MESURE

J.-P. TOUZEL

Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A.,
11104 Narbonne

INTRODUCTION

Parmi les méthodes d'analyse utilisées dans la mesure et le contrôle de la pollution des eaux, la demande biochimique en oxygène (DBO) est la plus ancienne et la plus controversée. L'évaluation de la charge polluante d'une eau usée a certes pu être faite depuis qu'on connaît les techniques d'oxydation chimique en phase aqueuse, permettant de chiffrer en équivalents-oxygène la quantité de matière organique dans l'échantillon. Mais, outre qu'elle dépend du degré d'oxydabilité des composés présents, cette méthode, connue sous le nom de demande chimique en oxygène (DCO), ne tient pas compte de la nature biologique de la décomposition des eaux usées.

Dès 1868, en Angleterre, Frankland (1908) trace les premières courbes de consommation d'oxygène. Cependant, l'auteur attribuait cette consommation à des réactions strictement chimiques et ce n'est qu'en 1884 que Dupré suggéra que les microphytes de l'eau pouvaient utiliser l'oxygène dissous. Toutefois, le test le plus utilisé au siècle dernier dans les services d'hygiène de l'eau était le test de putrescibilité qui consistait en une appréciation olfactive et visuelle de l'échantillon, complétée éventuellement par une évaluation de l'état d'oxydo-réduction à l'aide du bleu de méthylène.

Phelps (1909) a combiné les essais de putrescibilité et les données de consommation d'oxygène et a proposé une équation chimique pouvant représenter le processus de la demande biochimique en oxygène : substrat + bactéries + O_2 + facteurs de croissance $\rightarrow$ CO_2 + H_2O + bactéries multipliées + énergie.

C'est également Phelps (1909) qui présenta une loi de vitesse de réaction identique à celles des réactions monomoléculaires afin de décrire le processus de désoxygénation biologique. Cette approche mathématique donne au test une dimension nouvelle. La nécessité d'évaluer l'appauvrissement en oxygène des milieux par suite de l'assimilation de substances solubles déversées par l'homme donna aux essais de Phelps une audience accrue. Dès lors, il s'imposait de normaliser les conditions de l'essai, ce que le gouvernement américain fit dès 1917, année où le test fut introduit dans la troisième édition des « Standard methods for the examination of water and waste waters ».

De nombreuses études ont dès lors été consacrées au test tant pour essayer de comprendre les phénomènes qu'il met en jeu que pour en préciser l'emploi dans la pratique, afin d'éclairer la signification des résultats numériques. De ces nombreuses études il n'est pas possible de dresser une liste exhaustive. Nous nous bornerons à signaler les plus significatives.

I. — LA DBO_5 PAR DILUTION

1. — *Théorie et pratique*

La DBO_5, ou demande biochimique en oxygène, représente la quantité d'oxygène consommée par les germes aérobies pour assurer la décomposition, dans des conditions bien spécifiées, des matières organiques contenues dans l'eau à analyser. Le principe de la méthode consiste à mesurer la quantité d'oxygène dissous dans le milieu d'incubation au début et à la fin d'une période de 5 jours, pendant laquelle l'échantillon est maintenu à l'abri de l'air, à 20°C et dans l'obscurité pour empêcher l'éventuelle formation d'oxygène par des algues.

Selon McKinney (1962), « le test de la DBO_5 fut suscité par le fait qu'en Angleterre aucun cours d'eau n'avait plus de 5 jours de temps d'écoulement (entre source et embouchure). Ainsi, la DBO_5 est la demande maximum en oxygène qui aurait pu se manifester dans n'importe quel cours d'eau anglais ».

La principale contrainte qui résulte des conditions expérimentales est la teneur initiale en oxygène, limitée par la solubilité de ce gaz dans l'eau à 9,17 mg/l à 20°C. Ceci signifie qu'il sera impossible de mesurer des consommations d'oxygène excédant cette valeur sans passer par une dilution préalable, d'où le nom de méthode par dilution pour la DBO_5.

Pour effectuer des mesures de DBO_5, on aura en fait besoin d'un matériel très simple : des récipients individuels, genre erlenmeyers à bouchons rodés pour assurer une fermeture aussi hermétique que possible, une étuve et un moyen de dosage de l'oxygène dissous dont le plus commode est sans conteste l'analyseur d'oxygène à électrode.

Afin de favoriser l'assimilation de la matière organique, on doit veiller à ce que le milieu ne soit pas dépourvu d'oligo-éléments (Mg, Ca, Fe) ni de nutriments azotés et phosphorés (sels d'ammonium et phosphates). Enfin, il faut que l'échantillon soit ensemencé avec une population de micro-organismes contenant des germes aérobies. De tous les facteurs, celui de la nature et de la concentration de cet inoculum est sans doute le plus difficile à normaliser. Toutefois, les critères retenus pour le choix de l'inoculum semblent être les suivants : nécessité d'une population hétérogène comportant des germes variés pouvant (alternativement) assimiler des produits organiques très diversifiés, susceptibles de se présenter dans les eaux à analyser ; possibilité d'obtenir un inoculum de composition relativement constante dans le temps, afin d'assurer la reproductibilité des résultats.

Bien que ces critères soient très difficiles à respecter, on a estimé que les populations microbiennes provenant d'un collecteur principal d'égout, d'une eau de rivière, voire d'un échantillon de terreau pourraient convenir.

La normalisation du test de la DBO_5 (Norme A. F. N. O. R., 1971) prévoit ainsi les différentes contraintes quant aux nutriments, à l'eau servant à la dilution et à l'inoculum et décrit en détail les opérations à effectuer ainsi que les calculs donnant la valeur de la DBO_5.

Pour le calcul de la DBO_5, il est nécessaire d'effectuer une correction pour l'introduction d'éventuelles substances organiques consommant l'oxygène et provenant de l'inoculum et surtout de la respiration endogène de l'inoculum, c'est-à-dire de la consommation d'oxygène nécessaire au maintien de la viabilité des cellules en l'absence d'aliments externes et qui se traduit par la combustion des réserves intracellulaires. Ainsi, tout essai met en jeu un témoin qui contient les mêmes substances que l'échantillon, excepté l'eau polluée à tester.

Le fait qu'on ne connaisse pas d'avance la consommation en oxygène de l'échantillon oblige à effectuer des dilutions multiples parmi lesquelles on ne retiendra que celles correspondant à une consommation d'oxygène de 40 à 60 p. 100 de la quantité d'oxygène saturante (9,17 mg/l à 20°C). Aussi une estimation préalable, même sommaire, de la DBO_5 est d'une grande utilité car elle permet de réduire le nombre de dilutions pour un même échantillon. Cette estimation peut être effectuée par le biais de la mesure chimique de la DCO (Demande chimique en oxygène) qui traduit la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation chimique de la matière organique en CO_2 et H_2O (Norme A. F. N. O. R., 1969).

2. — *Mécanisme de la DBO*

La connaissance de la cinétique de consommation d'oxygène dans une fiole à DBO pourrait être riche d'enseignements quant au mécanisme des réactions qui s'y produisent. Or, la méthode normalisée par dilution s'oppose à toute approche cinétique car il est impossible d'opérer des prélèvements dans les fioles ; seule une approche point par point serait possible (une fiole pour chaque temps d'incubation) et cette approche est rendue extrêmement imprécise du fait des conditions différentes pouvant prévaloir dans chaque récipient.

Aussi a-t-on fait appel à des techniques servant simplement à mesurer la respiration cellulaire dans des conditions différentes de la méthode par dilution ; la plus connue et aussi la plus élaborée est la méthode de Warburg qui servit de base aux études sur le métabolisme cellulaire. Elle consiste à évaluer, en enceinte fermée, la consommation d'oxygène qui se traduit par une baisse de pression dans l'enceinte pourvu qu'on prenne soin de piéger le gaz carbonique dégagé (sur un papier imbibé d'une solution basique).

Assez longtemps, on estima que la cinétique de la DBO était représentée par une courbe assimilable à celle d'une réaction de premier ordre à vitesse décroissante. Ce n'est qu'en 1958 que Busch publia les premières données mettant en évidence la complexité de la courbe de consommation d'oxygène dans un essai de DBO. Il apparut que l'on pouvait obtenir des courbes dites en deux phases, séparées par un plateau, et des recherches fondamentales sur le mécanisme de la DBO s'orientèrent dès lors vers l'obtention du plateau et son explication (Heukelekian et Rand, 1955 ; Gaudy, Bhatla et Abu-Niaaj, 1963 ; Bhatla et Gaudy, 1964 ; Gaudy, Bhatla, Follett et Abu-Niaaj, 1965 ; Stones, 1970 ; Mathur et Grewal, 1971).

De très nombreuses explications existent quant à l'origine du plateau, et qui plus est, des cinétiques de DBO à plusieurs plateaux successifs peuvent être obtenues, surtout si l'on prolonge l'expérience au-delà de cinq jours.

Prenons d'abord le cas de cinétiques de l'ordre de 1 à 5 jours. Il s'avère qu'il est facile de mettre en évidence l'apparition d'un plateau entre la douzième et la quarante-huitième heures selon la longueur de la phase initiale de latence. Bien qu'on ne puisse *a priori* exclure le fait que la présence d'un mélange de substrats hétérogènes se traduit par une utilisation séquentielle correspondant à des degrés de biodégradabilité divers, les aliments les plus courants étant utilisés immédiatement et les plus compliqués nécessitant des périodes d'adaptation pouvant se traduire par des plateaux (Gaudy, 1963), on admet généralement que dans la première phase la consommation d'oxygène correspond à l'utilisation des substrats solubles.

Dès que tout le substrat soluble a été consommé, les cellules sont obligées d'utiliser leurs réserves pour se maintenir en vie. La population est alors à son maximum et la respiration se ralentit considérablement. Bien que certains auteurs (Busch et Myrick, 1960) aient suggéré que le plateau représente un temps de latence correspondant à la période pendant laquelle les cellules s'apprêtent à dégrader les réserves intracellulaires, il semble plus logique de penser que le plateau correspond à la période pendant laquelle les cellules vivent au ralenti en utilisant parcimonieusement leurs réserves. La consommation d'oxygène est alors extrêmement faible. Lorsque les cellules ont épuisé leurs réserves, certaines commencent à mourir en nombre de plus en plus grand et à se lyser, ce qui se traduit par une mise en solution de nouveaux aliments pour

les survivantes qui peuvent alors se multiplier. On observe un deuxième départ dans la consommation d'oxygène (Singh, 1971).

Il a été également suggéré que l'établissement d'une nouvelle utilisation active d'oxygène après une période de ralentissement (plateau) pouvait résulter de l'intervention d'une population de prédateurs se développant aux dépens de la population bactérienne ayant atteint son maximum de densité. Ceci implique la présence de prédateurs (protozoaires ciliés...) dans l'inoculum dès le départ, leur développement optimal ne pouvant se traduire par une consommation d'oxygène notable que lorsqu'ils disposent de proies en quantités suffisantes, c'est-à-dire au moment où les bactéries ont atteint leur maximum de population.

Dans le cadre de cette hypothèse, notons que des expériences faites avec des inoculums dépourvus de prédateurs montraient clairement qu'on pouvait quand même obtenir le plateau dit « de premier stade » (Busch, 1958).

Un autre sujet longuement discuté, et qu'on a également relié à la formation de plateau, est la question de la nitrification. Les bactéries nitrifiantes sont connues pour leur propriété de pouvoir transformer l'azote ammoniacal en nitrite et finalement en nitrate avec consommation d'oxygène. Ceci implique la présence d'azote ammoniacal dans le milieu en quantité telle que la croissance de bactéries nitrifiantes soit favorisée, ce qui peut se produire très vite si le milieu est extrêmement riche en matières azotées. Dans la plupart des cas, l'azote relativement peu abondant sera immédiatement dirigé vers les synthèses protéiques nécessaires à la multiplication cellulaire. Ce n'est que lorsque les cellules formées relargueront leur azote dans les processus de décomposition que celui-ci sera utilisé par les bactéries nitrifiantes qui pourront alors proliférer. C'est pourquoi la consommation d'oxygène due à une nitrification active ne s'observera que dans les dernières phases du processus de la DBO. Il est en tout cas fort peu probable que la nitrification prenne une part importante dans les cinq premiers jours du test, ce qui éviterait à la mesure de DBO_5 par dilution d'être entachée d'erreur supplémentaire. Toutefois, les normes mentionnent la façon de se préserver de la nitrification dans les cas où elle est à craindre. Il suffit d'acidifier l'eau à analyser soupçonnée de contenir des nitrificateurs. Le pH est amené entre 2 et 3 et ramené entre 7 et 7,4 après 15 minutes. L'eau de dilution sera ensemencée par des germes provenant d'une eau d'égout fraîchement décantée.

Il est certain que le phénomène de consommation d'oxygène dans un système biologique aussi complexe que celui du test DBO ne peut être décrit en termes simples comme on a d'abord eu la tentation de le faire. Dès le départ, les chercheurs ont voulu donner une description mathématique de la consommation d'oxygène et l'on peut rappeler à titre documentaire la progression de la conception mathématique de la courbe de consommation d'oxygène au cours d'un test de DBO.

La conception la plus simpliste consistait à considérer que la vitesse de consommation d'oxygène était proportionnelle à la quantité de substrat à dégrader, présente dans le milieu à un temps donné, pourvu que dans le milieu non aéré la concentration en oxygène ne soit pas limitante (c'est-à-dire toujours supérieure à 4 mg/l). Ceci entraîne comme formulation de la DBO du type premier ordre :

$$Y = L_a (1 - 10^{-kt})$$

où Y représente la DBO éliminée à l'instant t,

L_a est la DBO totale absolue et k la constante de vitesse,

L_a et k étant complètement inconnus, ils ne peuvent être atteints qu'empiriquement par des mesures point par point de Y en fonction de t.

Cette formulation mathématique semble donc d'un intérêt réduit. Sa limitation s'est accrue après la constatation que k, toujours considéré comme égal à 0,1 à 20°C, pouvait en fait varier de 0,05 à 0,35. C'est pourquoi Theriaut et McNamee (1930), puis Moore (1937) ont proposé que la réaction globale soit décomposée en une série de réactions de premier ordre ayant des constantes de vitesse différentes et pouvant être ou non décalées dans le temps. Cette méthode permet de décrire mathématiquement une courbe de DBO issue de données expérimentales, la précision

de l'approche dépendant du nombre de réactions composantes du premier ordre utilisées. On comprend dès lors l'arbitraire de ce procédé qui n'est basé sur aucune corrélation effective entre réaction du premier ordre composante mathématique et réaction biochimique individuelle faisant partie du phénomène DBO.

En suivant l'approche mathématique développée par analogie avec les réactions chimiques, on essaya d'appliquer à la DBO une loi du deuxième ordre. Cette approche était justifiée dans la mesure où les variables comme le taux d'oxygène dissous et le taux de nutriments (facteurs de croissance) étaient maintenus en concentration non-limitante. On pouvait dès lors faire dépendre la réaction des deux autres variables, à savoir la concentration résiduelle en substrat et la concentration en micro-organismes. Toutefois, les problèmes posés par la détermination de la concentration des micro-organismes ont conduit à utiliser pour celle-ci un équivalent-oxygène, tout comme il était possible de le faire pour exprimer la concentration en substrat. Bien que Woodword (1953) prétende que la description mathématique soit meilleure avec une équation du deuxième ordre qu'avec une du premier ordre, Young et Clark (1965) ne sont pas de cet avis. L'équation de deuxième ordre a en fait été trouvée convenable pour certaines portions de la courbe et tout à fait inappropriée pour d'autres (Revelle, Lynn et Riviera, 1965 ; Simpson, 1968). Le seul avantage de cette technique était la satisfaction apportée par le fait qu'elle tenait compte de la concentration de micro-organismes.

Ces formulations mathématiques, si elles ont pu être applicables dans certains cas, n'en restent pas moins limitées par le fait qu'elles assimilent la DBO à des réactions purement chimiques. Or, on sait bien que cela est très approximatif. Nous avons affaire à des bactéries qui sont elles-mêmes le siège de réactions biochimiques extrêmement complexes ; de plus ces bactéries peuvent à leur tour être utilisées par des prédateurs donnant lieu à des dynamiques de populations dont les lois nous échappent. Une étude approfondie de la cinétique de la DBO accompagnée d'une approche mathématique mieux reliées aux phénomènes participant au processus a été entreprise par Gates et Ghosh (1971) qui distinguent trois grands sous-processus de consommation d'oxygène : celui correspondant à l'utilisation du substrat par les bactéries pour assurer les réactions de synthèse et la respiration, celui correspondant à l'ingestion des bactéries par les protozoaires pour assurer leurs propres synthèses et leur respiration, celui correspondant aux processus d'autodestruction de la biomasse (bactéries et protozoaires).

3. — *Utilisation du plateau comme paramètre pour raccourcir le temps d'incubation*

Dès la mise en évidence d'un plateau pouvant survenir avant cinq jours, des chercheurs se sont attachés à trouver une relation entre la DBO correspondant au plateau et la DBO en 5 jours. Ces tentatives se seraient traduites par un gain de temps considérable mais n'auraient pas permis d'obtenir une technique d'analyse suffisamment rapide pour des contrôles (monitoring) de rendement d'épuration.

L'utilisation du plateau a nécessité des études préalables tendant à prouver qu'il se produisait obligatoirement et à préciser les limites de temps dans lesquelles on pouvait s'attendre à le voir apparaître. Cette étude a fait l'objet des travaux de Busch (1961) et Gaudy *et al.* (1965) au cours desquels les auteurs se sont appliqués à vérifier la fréquence d'apparition du plateau dans diverses conditions et à essayer d'en fournir une explication. Il résulte de ces expérimentations que le plateau est un phénomène fréquent puisque se produisant dans plus de 80 p. 100 des cas. Toutefois, il est impossible de trouver une relation valable entre la quantité d'oxygène consommée au plateau et la charge polluante totale initiale. La présence du plateau n'est pourtant pas un accident. La partie initiale de la courbe correspond à la consommation d'oxygène, alors que les bactéries se multiplient grâce au substrat qu'elles consomment. Cette multiplication se traduit par la transformation du substrat en nouvelles matières cellulaires et réserves et par la combustion d'une partie du substrat en CO_2 et H_2O pour obtenir l'énergie nécessaire aux synthèses. Le pla-

teau représente la conversion complète du substrat en protoplasme cellulaire, tout au moins lorsqu'on travaille avec un substrat simple, pur et biodégradable. La reprise de la consommation d'oxygène après le plateau peut être due à de multiples causes, dont la plus communément admise est la métabolisation active des réserves ou la croissance d'une population secondaire de composition nouvelle.

4. — *Bilans énergétiques et matériels*

Les progrès dans la compréhension du phénomène conduisirent naturellement les chercheurs à faire la part de la synthèse et de la respiration dans le processus de la DBO.

D'un point de vue absolument théorique, le test DBO idéal serait celui dans lequel toute la substance carbonée soluble serait transformée en CO_2 et H_2O comme dans une combustion banale. Il commencerait avec une certaine concentration de micro-organismes et une charge en substrat déterminée, oxygène et nutriments étant par ailleurs non-limitants, et il serait définitivement achevé lorsqu'on serait revenu à la même concentration en cellules qu'au départ, après avoir traversé des périodes de proliférations cellulaires avec épuisement du substrat, puis à la lyse progressive de toutes les cellules formées, ces phénomènes cycliques se reproduisant jusqu'à ce que les dernières cellules se retrouvent dans un milieu ne contenant plus de carbone en solution.

Le cycle que nous venons de décrire ne peut être bouclé qu'au bout de périodes de temps assez longues ; il apparaît intéressant de pouvoir, à des intervalles d'incubation donnés, déterminer la partie de substrat qui a été transformée et celle qui a été « brûlée ». Ainsi, de la connaissance de la quantité de carbone résiduel et de celle engagée dans les synthèses, on peut déduire la quantité qui a été « respirée » à partir de la quantité totale initiale.

La répartition du substrat entre respiration et synthèse est un phénomène de première importance dans les études permettant la sélection d'un procédé de traitement biologique des eaux usées ainsi que sa réalisation. On a pu dans certains cas estimer la répartition du substrat par la mesure de la quantité d'oxygène utilisée et par la disparition du substrat évaluée par des mesures de la demande chimique en oxygène (DCO).

Ainsi la quantité de DCO soluble enlevée, qui n'est pas comptée comme utilisation biologique d'oxygène, est supposée dirigée vers la synthèse cellulaire.

Il est clair que de telles suppositions, si elles peuvent paraître acceptables dans le domaine pratique et les études pilotes, devaient susciter des vérifications en recherches, donnant l'impulsion aux calculs de bilans.

L'établissement d'un bilan implique la mesure séparée des trois valeurs : matière carbonée soluble résiduelle, matière carbonée respirée (CO_2 formé ou O_2 utilisé), matière carbonée incorporée dans les cellules (synthèse).

Si la mesure de la quantité d'oxygène consommé pouvait être facilement atteinte par des techniques respirométriques, les quantités de substrat carboné en solution et en suspension (carbone incorporé dans les cellules) n'ont pu être raisonnablement évaluées que grâce à la mise au point de techniques de mesure de DCO rapides et efficaces. Toutefois, la technique DCO n'est pas absolument satisfaisante dans la mesure où certains composés particulièrement stables résistent à toute oxydation chimique. L'avènement d'analyseurs de carbone organique total a permis de pallier cet inconvénient et de faire des calculs de bilans plus précis.

5. — *Critiques*

Le test de DBO_5 par dilution est donc la reproduction au laboratoire d'un phénomène biologique à la fois complexe et très répandu dans la nature, consistant en la croissance de germes aérobies sur un substrat carboné de composition souvent inconnue.

Son but premier est de toute évidence la mesure de la désoxygénation des milieux naturels récepteurs à la suite d'un déversement d'effluents chargés en matières organiques.

Compte tenu des possibilités de réoxygénation de ces milieux, le test peut permettre la pré-

vention de conditions d'anaérobiose. Aujourd'hui cet aspect du test est pratiquement négligé. La quantité d'oxygène soustraite au milieu par suite de la présence de molécules organiques en solution en quantités anormalement élevées est directement reliée à la charge polluante représentée par ces molécules avec l'intervention de la notion de biodégradabilité.

En effet, l'oxygène consommé l'a été du fait de l'assimilation par les micro-organismes de tout ou partie des substances carbonées dissoutes. Cette dégradation biologique traduite en équivalents-oxygène constitue effectivement une mesure du pouvoir épurateur des milieux récepteurs.

A la lumière des considérations théoriques précédentes, il faut remarquer que la quantité d'oxygène utilisée par les micro-organismes est une mesure par défaut de la quantité de matière carbonée enlevée à la solution. Une partie non négligeable de cette matière a été en outre effectivement soustraite à la solution et transformée en matière constitutive des cellules nouvellement formées et son oxydation n'est que momentanément suspendue. La masse cellulaire formée représente en effet une pollution potentielle dans la mesure où cette masse peut à nouveau se transformer en matière carbonée soluble par suite de la mort des cellules. En outre, cette masse cellulaire continuera jusqu'à sa mort à utiliser l'oxygène pour sa survie : respiration endogène sur les réserves cellulaires accumulées lorsque la nourriture était abondante.

Quoi qu'il en soit, et indépendamment de la masse cellulaire accrue, la valeur de la DBO_5 représente bien une fraction de substance carbonée complètement dégradée en CO_2 et H_2O à travers les voies cataboliques et la chaîne respiratoire. On peut donc voir dans ce test la mesure d'une charge polluante biologiquement éliminable dans une période donnée et par une population donnée

Il est bien évident que la DBO_5 ne peut représenter la charge polluante totale, parce que certaines molécules peuvent être difficiles ou impossibles à assimiler par les micro-organismes utilisés ou parce que la période de temps choisie pour l'incubation ne peut suffire à l'oxydation totale, même si la charge polluante est essentiellement assimilable.

C'est pourquoi toute mesure de DBO est presque inévitablement accompagnée d'une mesure de DCO. La DCO (exprimée également en mg O_2/l) représente la quantité d'oxygène nécessaire à l'oxydation chimique en phase liquide de la matière organique dissoute. Cette valeur exprime donc en équivalents-oxygène la quantité de substance carbonée présente. Sa comparaison avec la valeur de la DBO_5 est de plus avantageuse dans l'estimation du degré de biodégradabilité.

Pour prendre des cas limites en guise d'exemple, une solution ayant une DBO très faible par rapport à sa DCO sera classée comme non biodégradable alors que si sa DBO est voisine de sa DCO elle pourra être déclarée parfaitement biodégradable.

En fait, il est impossible que la valeur de la DBO_5 puisse atteindre la valeur de la DCO pour les raisons que nous avons énumérées plus haut. On s'accorde toutefois pour reconnaître qu'un rapport DBO_5/DCO supérieur à 1/2 dénote une biodégradabilité satisfaisante (Singh, 1971). Un rapport DBO_5/DCO nettement inférieur à 1/2 permettrait ainsi de déceler soit la présence de substances toxiques qui retardent ou arrêtent la biodégradation (métaux lourds, cyanures, etc.), soit la présence de substances carbonées, elles-mêmes résistantes à la décomposition biologique.

Cette utilisation de la DBO comme moyen de caractériser un effluent selon son degré de biodégradabilité a consacré le test dans tous les milieux concernés par la lutte contre la pollution.

C'est dans ces milieux qu'on a également développé l'utilisation du test comme moyen de contrôle du rendement d'une station d'épuration. Mais cette pratique est sujette à caution. En effet, la station d'épuration met en œuvre à grande échelle les mêmes phénomènes que ceux qui interviennent dans le test DBO, c'est dire que si le rendement d'épuration est bon, on obtiendra à la sortie une eau ayant une faible valeur de DBO_5, mais pouvant encore renfermer des substances difficilement biodégradables. La valeur de la DBO_5 à la sortie sera donc faible ce qui exagérera l'efficacité de l'épuration. Un autre cas pouvant survenir est que l'effluent final d'une station d'épuration soit très riche en composés azotés solubles libérés, par suite de la décomposition de la biomasse après un jeûne prolongé. Les phénomènes de nitrification peuvent alors prédominer avec un tel échantillon dans la fiole à DBO et on aura une valeur élevée de la consommation d'oxygène due à la nitrification (formation de nitrites et nitrates à partir de composés aminés). Le rendement de la station sera ainsi masqué par la nitrification.

La différence de DBO_5 entre « entrée » et « sortie » d'une station d'épuration est donc une mauvaise manière d'évaluer l'efficacité du traitement. De plus, le fait qu'il faille attendre 5 jours pour obtenir le résultat du test a définitivement écarté la DBO_5 comme paramètre de contrôle opérationnel.

Par conséquent, et bien que la DBO_5 soit encore de nos jours utilisée pour calculer des rendements d'épuration, son utilité première consiste en l'évaluation d'une charge polluante biodégradable.

Mais est-elle utilisable pour toutes les sortes de charges polluantes? Évidemment pas. Certains échantillons (en particulier les rejets industriels) peuvent en effet contenir des molécules chimiques dont la dégradation biologique ne sera pas immédiate et nécessitera une adaptation.

Durant les 5 jours du test, l'adaptation pourra rarement être effectuée à temps pour qu'une dégradation effective prenne place. Dès lors la charge polluante échappe complètement à la mesure.

La norme américaine (Standard methods, 1965) envisage ce cas et recommande alors d'abandonner l'ensemencement standard habituellement prélevé sur un collecteur d'égout municipal pour un inoculum plus adapté à l'eau usée industrielle ; pour cela on utilise comme eau de dilution l'eau de la rivière dans laquelle l'effluent en question est déversé ; cette eau de dilution est prélevée plusieurs kilomètres en aval du point de déversement où la probabilité de présence d'une microflore adaptée est raisonnable. Si cette procédure est trop aléatoire ou peu commode, la norme suggère de développer au laboratoire une population adaptée provenant d'une eau d'égout.

Il est bien évident qu'on introduit ainsi un facteur supplémentaire peu compatible avec la normalisation.

Déjà la nature de l'ensemencement était sujette à caution : pouvait-on être certain que la microflore prélevée sur une eau d'égoût serait la même en nature et composition quelle que soit son origine géographique ? En fait, le résultat de la DBO est étroitement dépendant de la nature de l'inoculum et devant l'impossibilité de développer un inoculum standard commercialisable, les normes se sont accordées pour reconnaître que celui provenant d'une eau d'égout urbaine était à la fois le plus accessible et celui dont la composition (faible nombre d'individus mais grande variété d'espèces) était la plus facile à retrouver tout autour du globe. Développer un inoculum adapté introduit donc un facteur local qui nuit à la reproductibilité des résultats, car la période d'adaptation et les conditions dans lesquelles elle est faite sont autant de facteurs qui, *a priori*, ont une influence sur la valeur de la DBO obtenue.

Il semble donc plus logique de garder la DBO dans sa forme stricte avec son inoculum standard. Quand on se trouve devant une eau usée industrielle, le test DBO risque de donner une valeur très faible alors que la DCO sera élevée. Si l'on veut envisager un traitement biologique d'une telle eau, il est alors aussi avantageux d'effectuer un essai de traitabilité en petit réacteur que de faire une DBO avec inoculum adapté. L'essai de traitabilité consiste dans sa plus simple forme en l'aération de l'eau usée en présence d'une population microbienne donnée, la progression de l'épuration étant suivie par exemple par la mesure de la DCO du liquide centrifugé en fonction du temps.

Si ces mesures de DBO sont jugées indispensables, il est certain qu'elles devront alors être faites en utilisant comme inoculum la population acclimatée, développée et perpétuée en laboratoire.

6. — *Précision de la méthode par dilution*

De nombreuses causes d'erreurs font du test DBO une technique peu précise. La principale raison est son caractère de test biologique ; il est donc impératif de répéter les mesures. Les causes d'erreurs provenant de la lecture de l'appareil de mesure sont en outre amplifiées par le facteur dilution. C'est pourquoi certaines normes (Norme belge, 1956) recommandent de ne pas mesurer la DBO pour des eaux usées nécessitant une dilution supérieure à 1 000 fois. Il est pourtant des cas fréquents où l'on est contraint de dépasser cette limite, notamment dans les eaux usées d'industries alimentaires où la DBO peut atteindre 40 000 mg O_2/l.

Il est courant d'admettre pour les résultats de DBO une variation de $\pm$ 10 p. 100 (Norme

américaine, 1965). Les Belges tolèrent un écart de ± 15 p. 100, en particulier pour des dilutions importantes. Certains auteurs ont même publié des valeurs de DBO avec un écart-type de ± 20 p. 100 de la valeur moyenne sur une eau d'égout synthétique (Ballinger et Lishka, 1962).

Aucun étalon ne peut servir de référence absolue aux tests de DBO du fait de la variabilité inhérente à la nature et la provenance de l'inoculum. C'est pourquoi les normes font état de résultats obtenus par des laboratoires divers travaillant avec une solution carbonée bien définie composée de glucose et d'acide glutamique ; on dispose ainsi d'une moyenne de résultats et des écarts-types correspondant à diverses sources d'inoculum (Ballinger et Lishka, 1962 ; Norme américaine, 1965 ; Afnor, 1971). Si les résultats s'écartent nettement des valeurs publiées, la technique du manipulateur doit être mise en cause.

II. — AUTRES TECHNIQUES DE MESURE DE LA DBO

De tous les inconvénients de la méthode par dilution, c'est sans aucun doute la longueur de ce test qui a gêné considérablement les chercheurs préoccupés par le problème du contrôle des stations d'épuration et les a incités à développer une procédure plus rapide.

Les premières tentatives de raccourcissement du test ont suivi la mise en évidence du plateau et sa reproductibilité. A la suite d'essais effectués sur une solution de glucose, Busch (1961) trouva que le plateau représentait 41,1 p. 100 de la demande en oxygène théorique. Les difficultés d'extrapolation à des eaux usées de composition inconnue ont conduit l'auteur à abandonner cette voie.

C'est d'observer que la disparition du substrat en solution était l'un des premiers phénomènes mesurables dans la progression du test qui a conduit le même auteur à introduire la notion de demande biologique en oxygène totale ou DBTO.

1. — *La DBTO*

La demande biologique totale en oxygène (DBTO) est définie comme la diminution nette de la DCO soluble. Elle représente donc une quantité de matière carbonée (exprimée en équivalents-oxygène) ayant été soustraite à la solution par le biais des micro-organismes, c'est-à-dire à la fois par combustion (respiration) et par stockage intracellulaire et synthèse de nouvelles cellules.

La DBTO représente donc autre chose que la DBO_5 qui, en ne mesurant que l'oxygène respiré, ne tient pas compte du carbone soustrait à la solution pour être incorporé dans les cellules. La DBTO traduit simplement la diminution totale de la pollution soluble.

Le test de la DBTO consiste à la mise en culture d'un inoculum suffisamment concentré (« mass culture ») pour permettre une assimilation rapide des substances biodégradables ; tout matériel organique soluble biologiquement utilisable doit être complètement absorbé et métabolisé au cours de l'aération. L'oxygène est fourni à discrétion par un système de barbotage d'air. On poursuit l'expérience en effectuant des mesures de la DCO soluble à différents intervalles jusqu'à ce que celle-ci ne diminue plus. La DCO résiduelle peut être constituée de matériel difficile à biodégrader ou de produits relargués par des cellules. La différence entre la DCO soluble initiale et la DCO minimale obtenue après aération donne la DBTO.

L'avantage de cette méthode est sa relative rapidité. Les auteurs (Hiser et Busch, 1964) déclarent que le temps nécessaire au test est de l'ordre de 6 à 8 heures y compris la durée des analyses initiales et finales. Le procédé peut être appliqué à des eaux usées industrielles pourvu que l'inoculum ait été convenablement acclimaté.

Son utilité est évidente dans le contrôle des stations d'épuration où l'on peut disposer à tout

moment d'un inoculum adapté. Il peut ainsi servir à la surveillance journalière et au calcul des charges.

Les inconvénients proviennent de l'étape de filtration sous vide à travers un filtre à membrane à pores (Millipore) de 0,45 μ de diamètre (Busch *et al.*, 1962). Outre que certains échantillons peuvent filtrer difficilement ou bloquer le filtre, certains composés organiques volatils risquent d'être perdus au cours de cette étape. Ces difficultés mises à part, la précision est celle du test DCO avec toutes les implications concernant le degré d'oxydabilité des molécules par ce procédé non-spécifiques mais à l'action duquel certaines molécules (trop simples ou trop stables) échappent.

Encore tout récemment, d'autres auteurs (Mullis et Schroeder, 1971) se sont intéressés à la notion de DBTO pour proposer un test rapide convenant au contrôle opérationnel d'une station d'épuration. Il s'avère que, malgré le raccourcissement important obtenu par rapport à la DBO_5, la technique de la DBTO semble encore trop longue puisque en pratique une prolongation de la période d'aération est nécessaire pour s'assurer que la DCO du filtrat est bien à son minimum. Afin d'y remédier, on a essayé d'augmenter encore l'importance de l'inoculum mais, devant l'insuffisance des résultats, il a été proposé d'établir une corrélation entre la DCO de l'eau usée et sa DBTO. Établir une telle corrélation a toujours été envisagé même entre DBO_5 et DCO, étant donné les avantages immédiats qu'elle procure, mais elle n'est théoriquement valable que pour une eau usée de composition constante dans le temps, ce qui n'est pas souvent le cas. On peut admettre un coefficient de corrélation constant sur une période de temps relativement courte et contrôler la corrélation à intervalles réguliers ce qui est possible avec certains types d'eaux usées, telles que les eaux domestiques, mais qui ne l'est pas avec des eaux industrielles (Bhatla et Gaudy, 1964).

Les essais effectués dans le cadre de la DBTO ont indiqué qu'en mesurant la DCO des cellules nouvellement formées au cours du test on pouvait par simple différence en déduire la DCO de la matière organique transformée en CO_2, ce qui est une voie détournée d'évaluation de la consommation en oxygène. La corrélation avec la DBO_5 est ici intéressante à déterminer. C'est sur ces bases que Catroux et Morfaux (1971) ont récemment proposé une nouvelle méthode de mesure de la DBO.

La DBO est considérée comme la différence entre la DCO du milieu initial ensemencé et du milieu final, micro-organismes inclus. On ne mesure donc pas de consommation d'oxygène mais plutôt la variation globale de niveau d'oxydation de la matière organique du système qu'on peut relier en première approximation à la disparition de la matière carbonée dissoute. Cette approche permet d'éviter les dilutions excessives de la méthode DBO_5 standard en travaillant en milieu ouvert avec apport continu d'oxygène par barbotage.

Il semble exister une bonne corrélation entre cette technique et la méthode standard par dilution. Il faut noter que la durée du test reste de 5 jours. Les avantages de cette méthode proviennent donc de la possibilité de travailler avec des concentrations en matières organiques plus fortes (jusqu'à 3 000 mg O_2/l en DCO) et d'éviter le tâtonnement imposé par la DBO_5 par dilution pour l'estimation de la dilution adéquate. D'autre part, cette méthode simple à mettre en œuvre peut bénéficier de l'automatisation mise au point pour la technique de DCO. L'inconvénient inhérent à la méthode semble être celui de l'obtention d'un échantillon homogène du milieu en fin de culture, des proliférations compactes de micro-organismes pouvant avoir eu lieu qui doivent être remis en suspension et bien dispersés.

2. — *Techniques respirométriques*

C'est également le souci d'éviter des dilutions contraignantes qui a orienté le développement des techniques respirométriques. On peut distinguer les techniques utilisant une atmosphère confinée de celles faisant intervenir un apport d'oxygène ou d'air en fonction du temps. De très nombreux types de respiromètres existent et ont été passés en revue par Montgomery (1967).

a) *Appareils à atmosphère confinée.*

Les appareils fonctionnant sous pression constante se réfèrent au modèle Sierp proposé en 1928 (cité par MONTGOMERY, 1967). Les mesures sont faites en observant un changement de volume dans la phase gazeuse alors que l'oxygène est utilisé pour la respiration des cellules. POPEL (1958, cité par MONTGOMERY, 1971) a apporté une modification à l'appareil original en introduisant un absorbeur de CO_2 et une agitation magnétique.

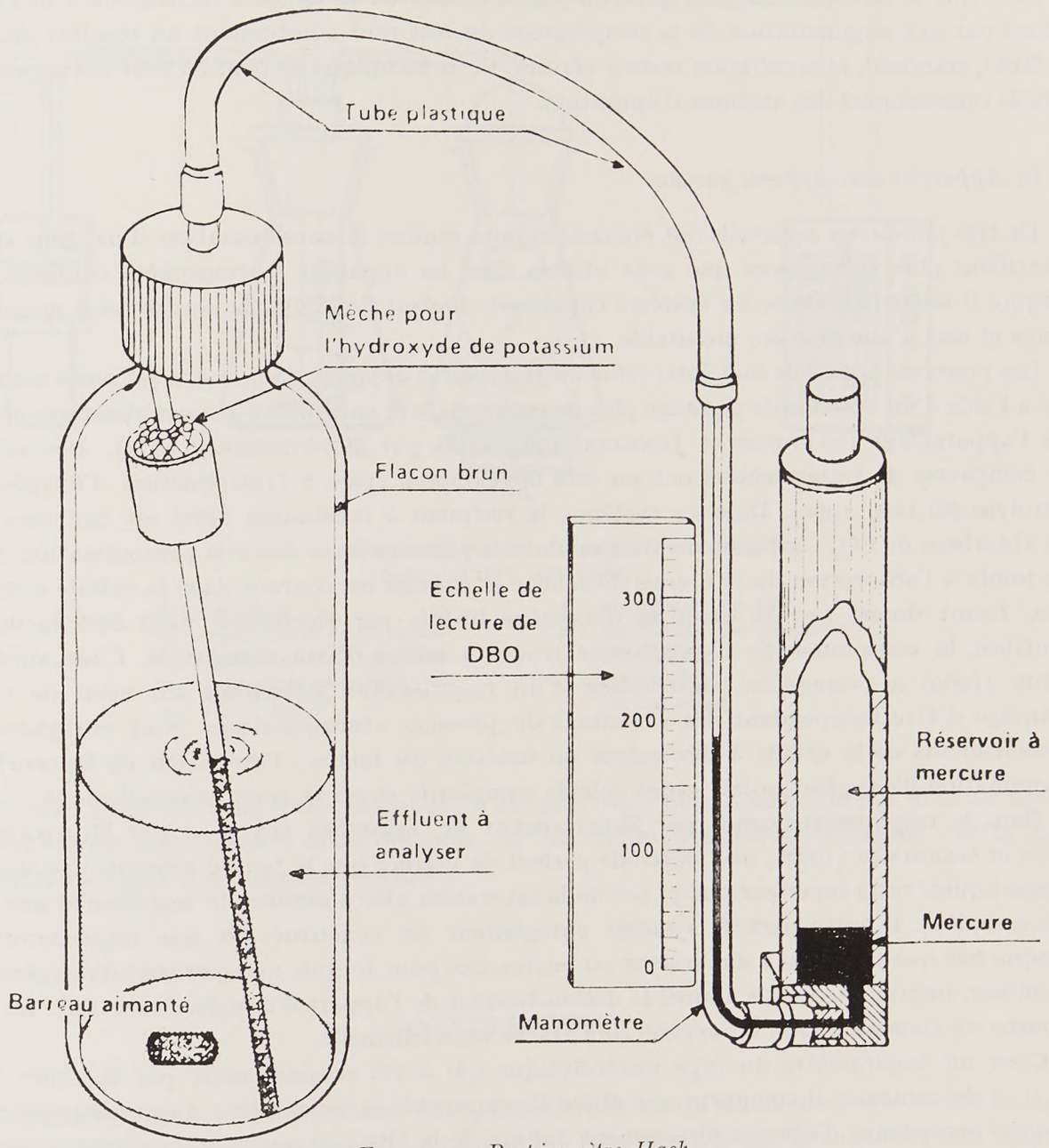


FIG. 1. — *Respiromètre Hach*
(reproduction autorisée)

Dans les appareils fonctionnant sous volume constant, la mesure consiste en l'observation d'un changement de pression dans la phase gazeuse. L'appareil de Warburg appartient à cette catégorie. Il fut utilisé pour la mesure de la DBO dès 1948 par CALDWELL et LANGELIER (cité par MONTGOMERY, 1971). Si l'utilisation du Warburg pour la mesure de la DBO a été introduite dans les « Standard methods » (10e et 11e éditions), elle en fut ensuite retirée sans explication. Il semble en fait qu'elle n'apportait pas plus de précision que la méthode par dilution tout en nécessitant une grande habileté d'opération et un matériel relativement spécialisé.

Un respiromètre simplifié à volume constant a été proposé par la firme Hach en 1967 (TOOL,

1967). Il s'agit de fioles connectées à un manomètre à mercure directement gradué en DBO. L'échantillon est agité magnétiquement en continu et le gaz carbonique produit par la respiration est absorbé par une mèche imbibée de potasse. En utilisant divers volumes d'échantillons, on peut choisir des échelles allant de 0-35 mg O_2/l à 0-350 mg O_2/l, ce qui permet de travailler à des doses plus fortes que celles de la méthode par dilution et de garantir un résultat plus représentatif. L'appareillage relativement simple a l'avantage de permettre de tracer une cinétique de la disparition d'oxygène (fig. 1).

Bien que le fabricant suggère que l'on puisse raccourcir le temps d'incubation à deux jours et demi par une augmentation de la température du test tout en obtenant un résultat analogue à la DBO_5 standard, la corrélation reste à vérifier. Cette technique ne peut en tout cas se prêter au contrôle opérationnel des stations d'épuration.

b) *Appareils avec apports gazeux.*

De très nombreux appareils ont été conçus pour étudier la consommation d'oxygène sur des échantillons plus volumineux que ceux utilisés dans les appareils à atmosphère confinée. C'est pourquoi il fallait adjoindre un système capable de fournir de l'oxygène au fur et à mesure des besoins et ceci d'une manière mesurable.

Les premiers appareils font intervenir un réservoir d'oxygène d'où le gaz est puisé manuellement à l'aide d'un système de pipetage plus ou moins élaboré entraînant des complications notoires dans l'appareillage (Snaddon et Jenkins, 1964, cités par Montgomery, 1971). Des versions plus compactes de respiromètres ont pu être développées grâce à l'introduction d'oxygène par électrolyse (Clark, 1960). Dans ce système, le récipient à incubation agité est toujours muni d'un absorbeur de CO_2 ; la baisse de pression dans la phase gazeuse due à la consommation d'oxygène jointe à l'absorption du CO_2 émis déclenche le passage du courant dans la cellule électrolytique. Étant donné que la quantité d'oxygène libérée par électrolyse peut être facilement quantifiée, la consommation d'oxygène se trouve à même d'être enregistrée. C'est ainsi que Bridie (1969) a proposé la construction d'un respiromètre présentant sur celui de Clark l'avantage d'être indépendant des variations de pression atmosphérique. Sont enregistrés les déclenchements de la cellule à électrolyse en fonction du temps ; l'obtention de la courbe de consommation d'oxygène se fait après calculs cumulatifs et on la trace manuellement.

Dans le respiromètre conçu par Montgomery et Gardiner (1971) et par Montgomery, Oaten et Gardiner (1971), une électrode permet de vérifier que le taux d'oxygène dissous dans la phase liquide reste supérieur à 20 p. 100 de la saturation afin d'assurer le maintien d'une aérobiose complète. D'autre part, le système enregistreur est constitué par une imprimante qui, à chaque fois que la cellule à électrolyse est enclenchée pour fournir une quantité d'oxygène bien déterminée, imprime le temps auquel le déclenchement de l'apport d'oxygène a été fait. Ici aussi la courbe de consommation d'oxygène sera tracée manuellement.

C'est un respiromètre du type électrolytique qui a été commercialisé par la firme Voith (fig. 2). Très compact, il comporte une étuve thermostatée et un système d'enregistrement perfectionné permettant d'obtenir directement l'allure de la DBO en fonction du temps, conjointement à un affichage numérique permettant de lire à tout moment la DBO « momentanée » de l'échantillon en mg O_2/l.

Les appareils du type électrolytique permettent donc, outre l'obtention de la valeur de la DBO_5, de fournir une allure de la courbe de consommation d'oxygène. L'avantage est incontestable ; on peut tirer de telles courbes des renseignements précieux tant sur la vitesse de consommation d'oxygène que sur d'éventuels retards dus à des périodes d'acclimatation. En outre, comme l'ont montré de Brabander et Vandeputte (1971), il est possible de chiffrer grâce à cet appareil l'influence inhibitrice d'une eau usée sur le pouvoir auto-épurateur du milieu récepteur.

Ces avantages font du respiromètre électrolytique enregistreur un instrument précieux dans les études de traitabilité et de toxicité. Son coût est évidemment élevé et ne justifie pas l'achat de tels appareils pour des mesures exclusives de DBO_5.

Notons toutefois que les mesures de DBO_5 obtenues par ces appareils sont très comparables à celles obtenues par la méthode de dilution (Liebmann, 1966 ; Bridie, 1969). Les comparaisons des résultats obtenus par les deux méthodes restent à établir dans un certain nombre de cas et

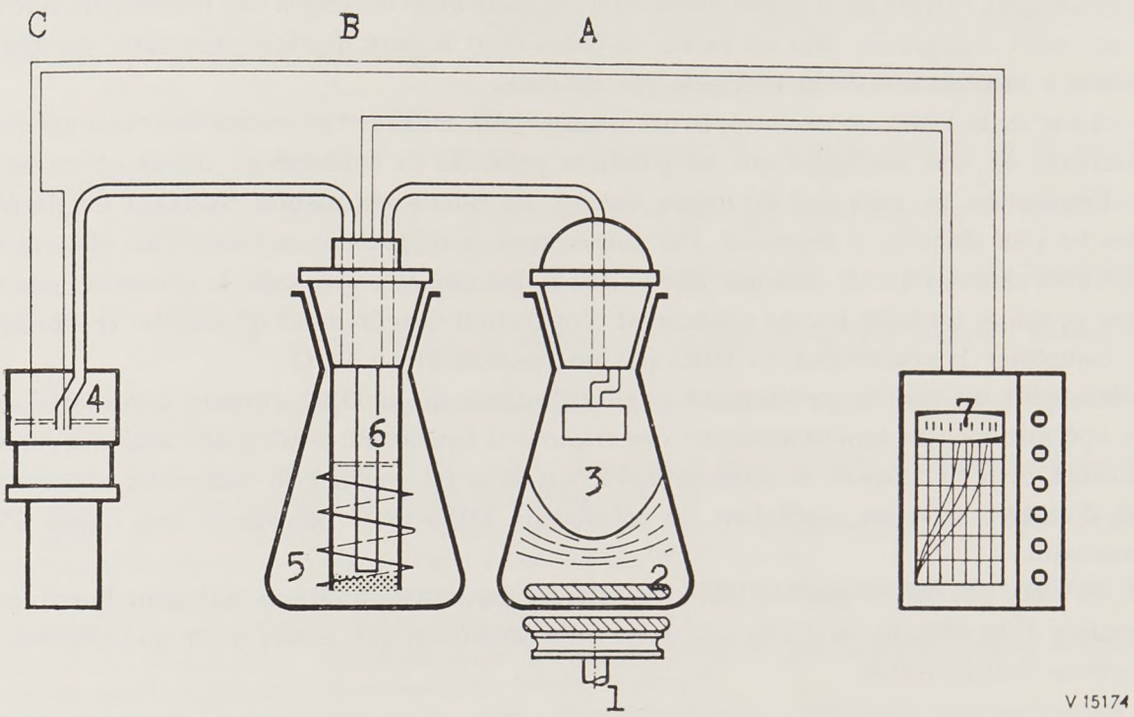


Fig. 2. — *Unité de mesure du respiromètre Voith*
(reproduction autorisée)

A : réacteur
B : générateur d'oxygène
C : indicateur de pression
1 : agitateur magnétique
2 : échantillon
3 : absorbeur de CO_2
4 : indicateur de pression
5 : électrolyte
6 : électrodes
7 : enregistreur

en particulier pour des eaux usées toxiques ; il est prévisible que la méthode par dilution donne alors des valeurs supérieures à celles obtenues par les techniques respirométriques, car la dilution atténuera l'effet des composés toxiques.

CONCLUSION

Le principal atout de la méthode de DBO_5 par dilution est qu'elle ne nécessite qu'un matériel de laboratoire relativement courant et peut donc être effectuée par des laboratoires aux moyens réduits pourvu que l'on possède une main-d'œuvre adéquate.

Étant donné la grande complexité des phénomènes qu'il met en jeu et le caractère biologique de ce test, l'interprétation des résultats ne peut être qu'imparfaite. Toutefois, la connaissance de la DBO contribue à la caractérisation première d'un effluent ou d'une eau usée : sa principale utilité est de chiffrer une charge polluante en termes de biodégradabilité, ceci grâce à la comparaison des valeurs DBO et DCO. Elle peut également contribuer au diagnostic de la présence de substances toxiques.

Malgré les nombreuses critiques justifiées qu'on a pu lui adresser, le test de la DBO, aussi imparfait qu'il soit, reste donc en vigueur dans tous les milieux concernés par la pollution des eaux. Ses utilisateurs doivent être conscients des limitations du test et ne donner aux valeurs obtenues que des interprétations nuancées.

Le problème de l'adaptation à des substances difficilement biodégradables, lié à la nature de la population de micro-organismes servant d'inoculum, est le principal facteur qui influe sur la valeur de la DBO de façon incontrôlable dans la technique normalisée de dilution.

L'utilisation des techniques respirométriques a permis de mieux cerner ces facteurs d'adaptation en visualisant l'allure de la consommation d'oxygène dans le temps. Ces techniques ont amené la mise au point d'appareils plus ou moins élaborés dont le prix, parfois prohibitif, contraint les laboratoires à l'utilisation de la méthode par dilution.

La valeur de la DBO est encore souvent utilisée pour chiffrer l'efficacité des stations d'épuration. Pourtant on doit souligner que les produits présents en solution au début et en fin de la période d'épuration ne sont pas de même nature, les micro-organismes utilisant en dernier les molécules les plus difficiles à dégrader. Par conséquent, si on mesure la DBO d'un effluent épuré, il y a de fortes chances qu'on obtienne une valeur faible due à la présence de substrats peu biodégradables, ce qui se traduira par un rendement d'opération exagérément optimiste. Il est donc très utile de compléter le rendement en DBO par un rendement en DCO.

La longueur du test ne permettant pas l'utilisation de la DBO comme paramètre dans le contrôle opérationnel du fonctionnement des stations d'épuration, c'est grâce à la mise au point d'une mesure de DCO rapide et automatisable qu'on a pu tourner la difficulté, encore que la nécessité d'établir ainsi un coefficient de corrélation DBO-DCO introduise une cause d'erreur supplémentaire.

Il n'en reste pas moins que la DBO demeure un paramètre fondamental pour la caractérisation première d'un effluent ou d'une eau usée, caractérisation qui, si elle n'est que grossière, n'en est pas moins indispensable.

Reçu pour publication en février 1974.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR, 1971. Demande biochimique en oxygène. Résultats des essais collectifs effectués sur une solution de glucose et d'acide glutamique. *Commission « Essais des eaux polluées industriellement »*, **90**/SC 1-doc 52, DBO n° 11.

BALLINGER D. G., LISHKA R. J., 1962. Reliability and precision of BOD and COD determinations. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **34** (5), 470-474.

BHATLA M. N., GAUDY A. F. Jr, 1964. Studies on the causation of phasic oxygen uptake in high energy system. *Engng. Bull. Purdue University. Proc. 19 th ind. Waste Conf. Part. 2, Engng. Extension Series* (117), 871-886. *J. Water. Poll. Contr. Feder.*, 1966, **33**, 1441-1451.

BRIDIE A. L. A. M., 1969. Determination of biochemical oxygen demand with continuous recording of oxygen uptake. *Water Res.*, (3), 157-165.

BUSCH A. W., 1958. BOD progression in soluble substrates. *Sewage ind. Wastes*, **30** (11), 1336-1349.

BUSCH A. W., MYRICK N., 1960. BOD progression in soluble substrates. III. Short term BOD and bio-oxydation solid production. *Purdue Univ., Eng. Bull., Ext. Ser.* (106), 19-27.

BUSCH A. W., 1961. An improved short-term, BOD test. *Water Sewage Works*, **108** (7), 255-260.

BUSCH A. W., GRADY Jr L., SHIVAJI RAO T., SWILLEY E. L., 1962. Short-term total oxygen demand test. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **34** (4), 354-362.

CATROUX G., MORFAUX J.-N., 1971. Une nouvelle technique de détermination de la demande biochimique en oxygène des eaux résiduaires. *Ind. aliment. agric.*, (12), 1699-1704.

DE BRABANDER K., VANDEPUTTE H., 1971. Évaluation quantitative de l'influence des décharges et des substances atteignant les eaux de surface sur le pouvoir auto-épurateur de celles-ci. *Tribune Cebedeau*, (329), 1-8.

DUPRÉ A., 1884. Report on changes in the aeration of water indicating the nature of impurities present in it. *Fourteenth annual report of the local Government Board.*, 1883-1884, Appendix B (11), 304.

FRANKLAND E., 1908. First report of the rivers pollution commission of 1868 par. 18 (1870) ; extracted in *Royal Commission, Fifth Report*, Appendix VI, 10.

GATES W. E., GHOSH S., 1971. Biokinetic evaluation of BOD concepts and data. *Proc. am. Soc. civ. Engrs. J. Sanit. Engng Div.*, **93** (3), 287-309.

GAUDY A. F., Jr, BHATLA M. N., ABU-NIAAJ F., 1963. Studies of the occurence of the plateau in BOD exertion. Proc. 18th ind. *Waste Conf. Purdue Univ. Extension Series.*

Gaudy A. F. Jr, Kohobrit K., Bhatla M. N., 1963. Sequential substrate removal in heterogenous populations. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **35** (7), 903-922.

Gaudy A. F. Jr, Bhatla M. N., Gaudy E. T., 1964. Use of chemical oxygen demand values of bacterial cells in waste-water purification. *Appl. Microbiol.*, **12** (3), 254-260.

Gaudy A. F. Jr., Bhatla M. N., Follett R. H., Abu-Niaaj F., 1965. Factors affecting the existence of plateau during the exertion of BOD. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **37** (4), 444-459.

Heukelekian H., Rand M. C., 1955. Biochemical oxygen demand of pure organic compounds. *Sewage ind. Wastes*, **27** (9), 1040-1053.

Hiser L. L., Busch A. W., 1964. An 8-hour biological oxygen-demand test using mass culture aeration and COD. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **36** (4), 505-516.

Liebmann H., 1966. *Expertise II concernant le Sapromat A6.* Communication de la firme Voith. Heidenheim (Brenz, R. F. A.).

Mathur R. P., Grewal N. S., 1971. BOD exertion in the carbonaceous phase of soluble substrate. *J. Inst. Engrs (India) pub. Health.*, **51** (2), 45-47.

Mc Kinney R. E., 1962. *Microbiology for sanitary engineers*, 172. 1st ed. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York.

Moore E. W., 1937. The oxygen demand of mixtures of activated sludge and sewage. *Sewage Works J.*, **9** (1), 12.

Montgomery H. A. C., 1967. The determination of biochemical oxygen demand by respirometric methods. *Water Res.*, **1** (10), 631-662.

Montgomery H. A. C., Gardiner D. K., 1971. Experience with a bacterial inoculum for use in respirometric tests for oxygen demand. *Water Res.*, **5** (4), 147-163.

Montgomery H. A. C., Oaten A. B., Gardiner D. K., 1971. An automatic electrolytic respirometer : its construction and use. *Effluent Water Treatment J.*, **11** (1), 23-31.

Mullis M. K., Schroeder E. D., 1971. A rapid biochemical oxygen demand test suitable for operational control. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **43** (2), 209-215.

Norme A. F. N. O. R., 1969. Essais des eaux. Détermination de la demande chimique en oxygène (DCO). (Méthode par le dichromate de potassium). Norme T 90-101.

Normes A. F. N. O. R., 1971. Essais des eaux. Détermination de la demande biochimique en oxygène. Norme T 90-103.

Norme américaine, 1965. *Standard methods for the examination of water and waste-water.* 415-421, 12th edition, Water Pollution Control Federation, American Public Health Association, Washington D. C.

Norme belge, 1956. N. B. N. 407. *Analyse des eaux. Eaux résiduaires et eaux polluées. Demande biochimique en oxygène* (BOD), 2-4, Institut belge de normalisation, Bruxelles.

Phelps E. B., 1909. The disinfection of sewage filter effluents. *U. S. geological Survey Water Supply Paper* (224), 75.

Revelle C. S., Lynn W. R., Rivera M. A., 1965. Bioxidation kinetics and a second order equation describing the BOD reaction. *J. Water Poll. Contr. Feder.*, **37** (12), 1679.

Simpson J. R., 1968. A second order equation, not based on ultimate oxygen demand, describing the first phase of oxygen uptake in biochemical oxygen-demand reactions. *J. Inst. Water. Poll. Contr.*, **4**, 1-23.

Singh R. C., 1971. Facts and fallacies about biochemical oxygen demand and modern developments. *J. Inst. Engrs (India) pub. Health.*, **52**, 25-31.

Stones T., 1970. A study of the biochemical oxidation of carbonaceous water. *Water. Poll. Contr.*, **69** (6), 699-703.

Theriault E. J., Mc Namee P. D., 1930. Sludge aeration experiments. I. Rate of disappearance of oxygen in sludge. *J. ind. Engng. Chem.*, **22** (12), 1-330.

Tool H. R., 1967. Comparative study of a new simplified manometric apparatus and the dilution method for determination of biochemical oxygen demand. *Amer. Chem. Soc., Div. Water-Wates Chem., Preprints*, **7** (1), 180-207.

Woodword R. L., 1953. Deoxygenation of sewage, a discussion. *Sewage ind. Wastes*, **25**, 948.

Young J. C., Clark J. W., 1965. Second order equation for BOD. *J. Sanit. Engng. Div., ASCE*, **91**, (SA 1), Proc. paper 4232, 43-57.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 113.

CHRONIQUE DES LIVRES

LE TRANSPORT MARITIME DES DENRÉES PÉRISSABLES SOUS RÉGIME DU FROID. — Institut international du Froid. — Paris, 138 p., 1973.

Cet ouvrage destiné au personnel navigant peut servir d'aide mémoire au technicien s'occupant de conservation par le froid des denrées alimentaires.

La première partie comprend des données générales relatives aux installations frigorifiques et aux conditions particulières applicables aux denrées de nature différente.
Des chapitres comme ceux relatifs à la « Contamination par les odeurs » ou à la « Compatibilité de chargement » donnent des renseignement utiles non seulement dans le cas de cargaisons mais aussi pour des stockages de longue durée en entrepôts frigorifiques.

La deuxième partie, la plus importante, est réservée aux produits végétaux. Après des rappels sur la physiologie des fruits et légumes, des monographies plus ou moins réduites sur différentes espèces sont regroupés en cinq chapitres.

— Fruits de zone tempérée : pomme, poire, raisin, abricot, pêche, prune et pruneau.
— Agrumes.
— Fruits tropicaux : banane, avocat, ananas.
— Légumes : tomate, aubergine, melon, pomme de terre, oignon, choux pommé, brocoli, chou-fleur, asperge, céleri, laitue, carotte.
— Autres produits horticoles : bulbes de fleurs, arbres, fleurs.

La troisième partie se rapporte aux produits d'origine animale : viande réfrigérée, viande congelée, poisson congelé, œufs, beurre, crème, crème glacée, fromage, aliments congelés emballés.

La dernière partie traite « des vivres de bord ».

C. FLANZY

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (1), 115-117.

INFORMATIONS

INSTITUT PASTEUR, PARIS
ENSEIGNEMENTS 1974-1975

Ces enseignements sont du niveau post-universitaire. Ils sont destinés aux diplômés des Facultés des Sciences, de Médecine, de Pharmacie et aux anciens élèves des grandes Écoles. Toutefois, des étudiants en fin de scolarité pourraient être également admis dans la mesure des places disponibles.

I. — ENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX

COURS DE MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE

Méthodologie — Anatomie fonctionnelle des bactéries — Physiologie microbienne — Fonction du gène et mutations — Échanges génétiques — Bactériophages — Régulation des biosynthèses.

Structure et physiologie des cellules eucaryotes — Anatomie structurale et biochimique des virus — Réplication des virus à ARN et à ADN — Génétique des virus — Virus oncogènes.

Plein temps, sauf le samedi après-midi, de fin septembre à fin février.

COURS DE MICROBIOLOGIE SYSTÉMATIQUE

Généralités — Techniques bactériologiques — Étude des divers groupes de bactéries d'intérêt médical.

Généralités — Techniques virologiques — Étude des divers groupes de virus d'intérêt médical.

Plein temps, sauf le samedi après-midi, de début septembre à début mars.

COURS D'IMMUNOLOGIE APPROFONDIE

Les techniques immunologiques — Les Immunoglobulines — Immunologie cellulaire.

Plein temps, sauf le samedi, de mars à juillet.

COURS D'IMMUNOLOGIE GÉNÉRALE

Méthodes de l'Immunologie — Antigènes, anticorps, réactions antigènes-anticorps — Immunochimie — Éléments d'Immunologie cellulaire.

Plein temps, sauf le samedi, de mars à juin.

II. — ENSEIGNEMENTS SPÉCIALISÉS

COURS DE MICROBIOLOGIE DU SOL

Bactéries responsables des cycles biologiques du carbone, de l'azote et des principaux éléments minéraux — Population du sol — Interactions des micro-organismes entre eux et avec les plantes — Facteurs édaphiques et climatiques — Humus et humification.

Plein temps, sauf le samedi après-midi (septembre : 4 semaines).

COURS D'IMMUNOLOGIE DES INFECTIONS BACTÉRIENNES ET VIRALES

Phénomènes immunitaires dans les infections bactériennes et virales — Modèles d'applications au diagnostic — Pathologie de l'immunité anti-infectieuse.

Plein temps, sauf le samedi, de mi-juin à mi-juillet.

COURS DE MYCOLOGIE MÉDICALE

Champignons pathogènes pour l'homme et les animaux : Morphologie, Physiologie, Biochimie, Écologie. Mycoses : Clinique, Diagnostic biologique, Histopathologie, Immunologie, Antifongiques,

Tous les après-midi, sauf le samedi et le matin deux fois par semaine (fin septembre à fin octobre).

COURS D'IMMUNO-HÉMATOLOGIE ET D'IMMUNO-PATHOLOGIE MÉDICALES

Immuno-hématologie (érythrocytaires, leucocytaires et sériques) — Immuno-pathologie des affections thyroïdiennes, gastriques, musculaires, rénales, hépatiques et des collagénoses.

Plein temps, sauf le samedi après-midi (juillet : 4 semaines).

COURS D'INITIATION A LA RECHERCHE EN ÉPIDÉMIOLOGIE DES MALADIES TRANSMISSIBLES

Disciplines biologiques — Disciplines écologiques — Disciplines expérimentales — Disciplines mathématiques : statistique, informatique, biomathématique.

Tous les après-midi, sauf le samedi (février-mars : 7 semaines).

III. — ENSEIGNEMENTS MÉTHODOLOGIQUES

COURS DE CULTURES CELLULAIRES APPLIQUÉES A LA VIROLOGIE

Méthodes de cultures cellulaires appliquées à l'étude des virus — Différents types de cultures cellulaires (cellules primaires, de lignée continue, etc.) — Isolement des virus — Différentes méthodes d'identification — Titrage des virus — Principales applications pratiques de ces méthodes.

Plein temps, sauf le samedi après-midi (novembre : 2 semaines) Nombre d'élèves : 20.

COURS DE MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Aspects physiques de la formation de l'image — Dispositifs — Méthodes de préparation des objets — Photomicrographie — Autoradiographie — Mesures — (Options : cryo-décapage, microscopie électronique à balayage).

Plein temps, sauf le samedi (mars : 2 semaines). Nombre d'élèves : 8.

COURS SUR LE MARQUAGE DES ANTICORPS

Immunoadsorbants — Marqueurs fluorescents, enzymes... Application aux recherches biologiques.

Plein temps (avril : 9 journées).

COURS SUR L'APPLICATION DES RÉACTIONS D'IMMUNOFLUORESCENCE ET IMMUNOENZYMATIQUES A L'ÉTUDE DES MALADIES DE L'HOMME

Affections bactériennes et virales — Immunopathologie — Antigènes tumoraux.

Plein temps (avril : 6 journées).

Le nombre de places étant limité, il convient de déposer les candidatures plusieurs mois à l'avance. Les dates de ces cours sont susceptibles de modifications d'une année à l'autre. Les candidats retenus en seront informés en temps voulu.

Les demandes de renseignements et les candidatures doivent être adressés au :

Secrétariat Général des Enseignements
Institut Pasteur - 28, rue du Docteur-Roux
75015 Paris

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *Résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11104 Narbonne, ou M. Mocquot, Station centrale de Technologie des produits animaux, 78350 Jouy en Josas. On demande deux exemplaires.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à cette même adresse.

Technologie agricole.

Le Directeur de la publication : M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 12-1974.

Dépôt légal : 4e trimestre 1974. N° d'impression : 1316.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1974

Vol. 23 . N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Enzymes et industries de cuisson à base de céréales

1re PARTIE

Colloque tenu à Paris les 6 et 7 novembre 1972

Les articles qui suivent ont fait l'objet d'exposés au cours du colloque « Enzymes et industries de cuisson à base de céréales » qui s'est tenu les 6 et 7 novembre 1972.

Nous remercions vivement le C. N. R. S. d'avoir bien voulu accueillir ce colloque dans son amphithéâtre, 15 quai Anatole France, 75007 Paris. Les travaux qui y sont rapportés ont été effectués dans le cadre de l'Action concertée « Amélioration et diversification des produits de cuisson à base de céréales » sous l'égide et avec l'aide financière de la D. G. R. S. T.

AVANT-PROPOS

Tout comme les enzymes, dont il va être question ici, agissent à faible dose sur les substrats appropriés, les interventions de la D. G. R. S. T. cherchent avec des moyens limités à mobiliser des organismes de recherche publics ou privés sur des objectifs précis.

L'objectif ici était double. Tout d'abord obtenir des informations d'ordre scientifique, mais pouvant faire l'objet d'applications pratiques à court ou moyen terme, sur le mécanisme d'action de certaines enzymes présentes ou utilisées dans la fabrication des produits de cuisson à base de céréales tels que : pain, biscottes, biscuits... Au-delà, un encouragement au développement de la recherche dans ce secteur important des industries alimentaires (environ 6 milliards de francs de chiffre d'affaires annuel) paraissait nécessaire pour la promotion d'une technologie concurrentielle et d'une meilleure maîtrise de la qualité des produits.

Les moyens ont été ceux de toute action concertée. Des crédits d'un montant approximatif de 1,8 millions de francs, prélevés sur le fonds de la Recherche, ont été octroyés par le Comité de Technologie alimentaire de la D. G. R. S. T. de 1968 à 1971 ; ils sont venus s'ajouter aux efforts propres déjà importants consentis par les organismes eux-mêmes. Ces crédits ont permis la mise en place d'une action de recherche collective et interdisciplinaire, où chercheurs et utilisateurs ont pu valoriser, dans un même souci d'efficacité, les contributions respectives et complémentaires de chacun.

Ce substrat scientifique a été fourni par un ensemble de douze laboratoires œuvrant à des titres divers dans le domaine des recherches sur les céréales : Station d'Amélioration des Plantes de l'I. N. R. A. à Versailles, laboratoires de Technologie des Céréales de l'I. N. R. A. à Paris et à Massy, chaire des Industries des Céréales de l'E. N. S. I. A. à Massy, pour la Recherche publique ; laboratoire de l'Association de Recherches des Industries alimentaires (A. R. I. A.), Centre technique des Unions de la Biscuiterie, Biscotterie (C. T. U.), École nationale supérieure de la Meunerie, Syndicat national de la Levure, pour les organismes professionnels ; Grands Moulins de Bobigny, Moulins de Pantin, Société Rapidase, Société des Unions chimiques Rhône-Poulenc, pour les industriels.

Les recherches, qui concernaient différents types d'enzymes : amylases, protéases, lipoxygénases, s'articulaient autour de trois préoccupations essentielles : caractéristiques et mode d'action des enzymes, isolement et purification, conséquences sur la qualité des produits et en particulier sur le goût du pain.

Cette action, ambitieuse par ses conséquences technologiques possibles et par le nombre des concours qu'elle a nécessité, vient de se terminer. Elle ne constitue vraisemblablement qu'une étape dans la voie de l'utilisation des enzymes. On pourra juger de ses résultats à travers le colloque et la présente publication.

Qu'il soit permis à cette occasion de souligner, au milieu de beaucoup d'autres collaborations compétentes et dévouées, le rôle prééminent qu'a pris à la réussite de cette opération M. Guilbot, membre du comité de Technologie alimentaire et agricole de la D. G. R. S. T., Directeur de la Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales, Massy I. N. R. A., animateur de cette action concertée et sans lequel la coordination serait restée un mot vide de sens.

E. Salmon-Legagneur

Secrétaire scientifique du Comité
« Technologie alimentaire et agricole »
D. G. R. S. T.

AMYLASES

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 127-139.

ISOLEMENT, PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS D'AMYLASES BACTÉRIENNES ET FONGIQUES

R. DELECOURT

Société Rapidase,
15, rue des Comtesses,
59113 Seclin

INTRODUCTION

Le programme de recherche du contrat prévoyait l'étude des enzymes dans la technologie des industries de cuisson. L'application des enzymes dans ces conditions présentait deux volets : étude scientifique de leur action sur chacun des substrats de farine, étude technologique de leur application dans l'industrie.

Le premier volet nécessitait donc la préparation d'enzymes purifiées exemptes de quantités décelables d'autres enzymes. Nous avons entrepris en 1968 la purification des enzymes suivantes : amylases bactérienne et fongique.

A. — PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DE L'ALPHA-AMYLASE BACTÉRIENNE DU *BACILLUS SUBTILIS*

Méthodes d'analyse

Nous avons d'abord étudié une méthode de dosage de l'enzyme prédominante et des enzymes étrangères.

1. Pour l'alpha-amylase, nous avons utilisé la méthode mise au point par l'Association internationale de Chimie céréalière (I. C. C.) en utilisant comme substrat les dextrines limites provenant de l'action d'un excès de bêta-amylase sur l'amidon soluble. Cette méthode mesure une constante empirique de vitesse. Comme on utilise un substrat naturel non défini et que malheureusement les méthodes de dosage de la dépolymérisation de l'amidon ou de ses groupes réducteurs ne sont pas non plus définies, il est impossible d'exprimer les résultats en unités internationales. Il faut signaler que les conditions utilisées sont assez éloignées des conditions optimales de l'alpha-amylase bactérienne. De plus, nous avons pu vérifier récemment que cette méthode n'élimine pas les susceptibilités particulières du substrat amidon et qu'elle donne des résultats différents avec les divers amidons solubles.

2. Pour le dosage des protéases, nous avons été moins heureux et de nombreux essais interlaboratoires n'ont pas permis de venir à bout des difficultés de la méthode d'Ayre Anderson.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 68-01-223-02-212-75-01) que nous remercions de son aide.

Nous avons donc utilisé une méthode sur caséine dans laquelle on fait agir la protéase pendant 30 mn à 37°C et pH 7,0 sur la caséine Hammarsten, puis on mesure la quantité d'acide aminé aromatique non précipitée par l'acide trichloracétique. L'unité PC est la quantité de protéase qui donne dans les conditions ci-dessus un hydrolysat dont la densité optique lue à 275 nm est la même que celle d'une solution de tyrosine contenant 1,5 µg par ml.

A cause des différences de pH d'action et d'affinité de substrat, nous n'avons trouvé aucune corrélation entre activité sur hémoglobine, caséine ou gluten pour des protéases différentes.

Méthodes de purification

Le milieu de fermentation du *Bacillus subtilis* est privé de ses germes par clarification par précipitation de phosphate de calcium, suivie d'une filtration. On termine par une filtration stérilisante. Après concentration sous vide, de façon à ramener le volume au quart du volume initial, on précipite l'alpha-amylase par le méthanol entre 1 et 2 volumes par volume de solution enzymatique. Le précipité est dissous, filtré puis dessalé par passage sur une colonne de Biogel P 10. La fraction contenant l'amylase, encore contaminée par de la protéase, est séchée par lyophilisation. Il n'a pas été possible de séparer amylase et protéase sur Sephadex G 100. En effet, l'amylase subit un retard important par interaction avec le dextrane (Frati et Caputo, 1970), retard pouvant aller jusqu'à l'inversion totale de l'ordre de passage, l'amylase (PM environ 55 000) passant après la protéase (PM environ 25 000) (fig. 1). L'amylase est alors adsorbée sur colonne de QAE Sephadex préalablement équilibrée avec un tampon *Tris* (HCl 0,01 M) à pH 8,0. Après lavage, l'amylase est éluée par le même tampon contenant du ClNa à concentration molaire. La fraction amylase est ainsi privée de protéase (fig. 2). On termine la séparation de fractions dénaturées et colorées par passage sur Biogel G 60.

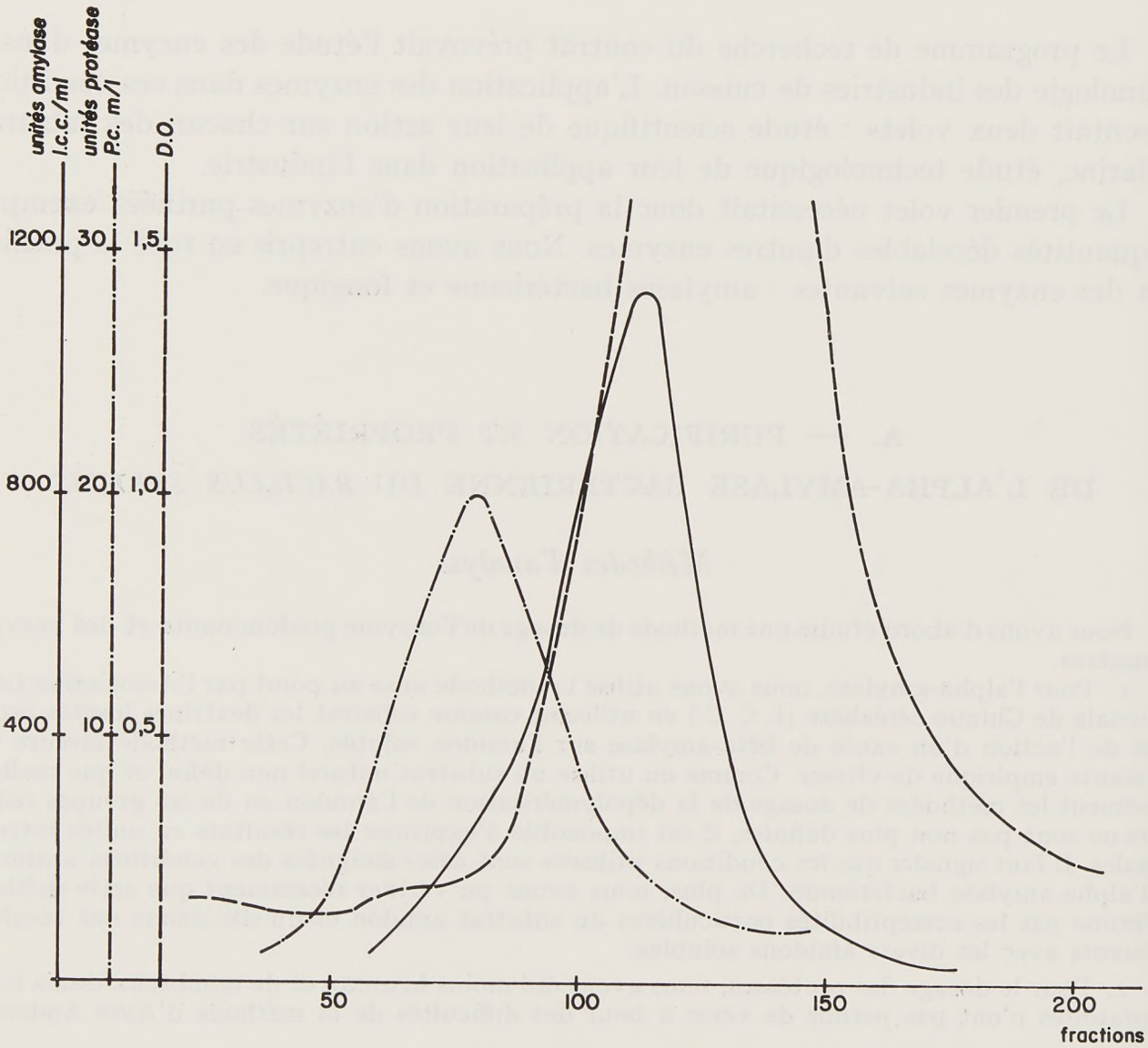


Fig. 1. — *Purification amylase bactérienne*
Inversion amylase-protéase sur Sephadex G-100

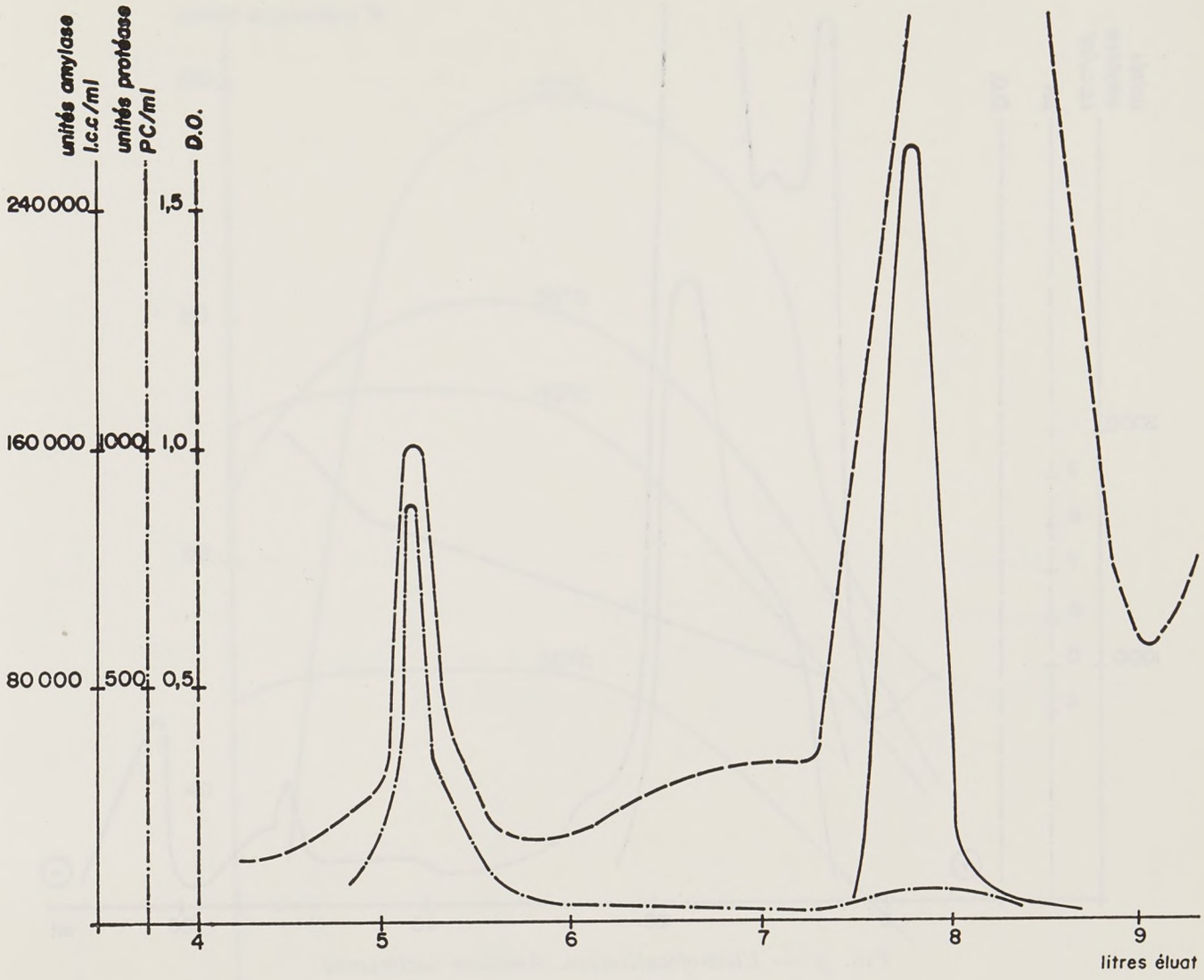


FIG. 2. — *Séparation amylase-protéase sur QAE Sephadex*

Résultats

1. *Évolution du titre enzymatique.*

	Activités amylasiques (U/g)	Activités protéolytiques (PC/g)	PC/ICC
	—	—	—
Milieu de fermentation . .	5 000	3 500	0,70
Précipité méthanolique .	200 000	15 000	0,07
Amylase purifiée	2 240 000	55	0,000 025

2. *Électrophorèse.*

L'électrophorèse sur papier (tampon véronal 0,1 M, pH 5,6, 140 volts, 90 mn) montre une seule bande avec traînée vers la cathode.

L'électrofocalisation montre un front de protéines inertes vers pH $i > 5$ et deux petites bandes plus alcalines dont l'une correspond probablement à la protéase inactivée (fig. 3).

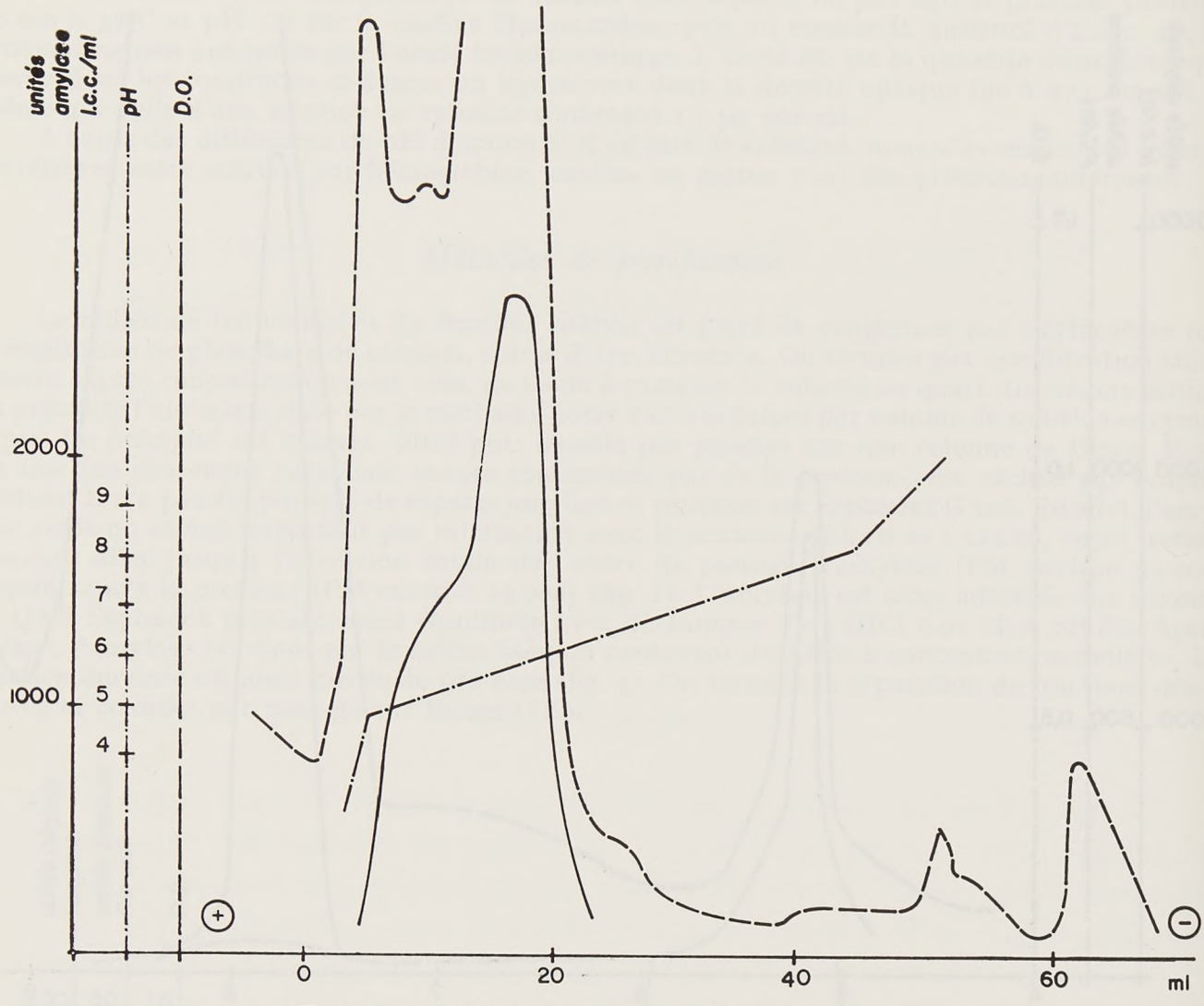


FIG. 3. — *Electrofocalisation. Amylase bactérienne*

3. *Analyse de l'amylase obtenue.*

Poids (mg)	0,600
Azote (p. 100)	16,1
Unités amylases A (ICC) (U/g)	2 240 000
Unités amylases/mg N	13 800
Unités protéolytiques PC	55
Unités PC/mg N	0,34

Propriétés de l'alpha-amylase bactérienne

Les propriétés de l'amylase bactérienne sont fortement influencées par la concentration de son substrat, l'amidon.

A faible concentration d'amidon (inférieure à 50 g/l), l'alpha-amylase bactérienne a une température optimale de 70°C (fig. 4) ; elle est protégée par des ions chlore et calcium, ce qui lui permet de résister sans pertes à des chauffages prolongés. Il reste 90 p. 100 d'activité après chauffage de 1 heure à 70°C, en eau dure, en présence de 2 g/l de ClNa.

Lorsque la concentration en amidon augmente fortement (au moins 30 p. 100), ce qui est le cas en panification, l'amylase bactérienne est protégée par son substrat

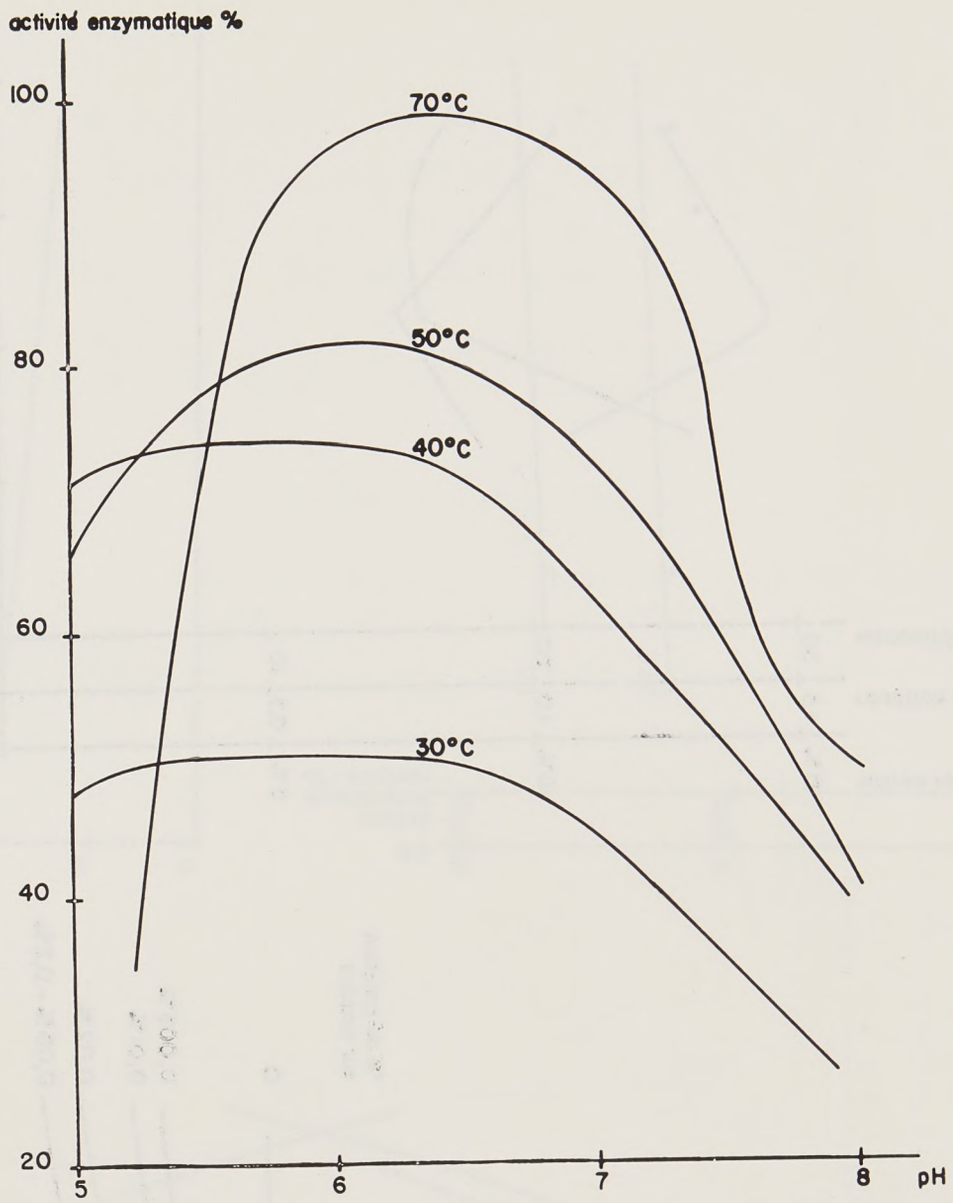


FIG. 4. — *Activité enzymatique de α-amylase bactérienne sur amidon en fonction du pH*

et l'influence des chlorures devient peu discernable. Par contre, on démontre facilement l'importance du calcium pour la liquéfaction de l'amidon (fig. 5). En particulier, la zone d'activité en fonction du pH est élargie. La figure 6 montre, par la mesure de la viscosité, de la coloration à l'iode et des sucres réducteurs, que le pH optimum de l'amylase bactérienne est 7,2 en l'absence de calcium avec une courbe d'allure étroite. La courbe suivante (fig. 7) montre dans les mêmes conditions, mais en présence de calcium, que la zone d'activité est considérablement élargie, spécialement vers l'acidité. Le pH optimum s'est déplacé vers 6,0-6,2 et cette enzyme peut même être utilisée vers 5,8.

La température optimale monte à 90°C et l'enzyme garde 70 p. 100 de son activité après un chauffage de 1 heure à 92°C en présence de 300 g/l d'amidon. Dans ces conditions, l'alpha-amylase bactérienne n'est pas complètement inactivée à 100°C et il reste au moins 10 p. 100 de l'activité initiale après un chauffage d'une heure à cette température. Il est nécessaire d'abaisser le pH à 4,9 si l'on veut obtenir une inactivation rapide à 100°C. Les figures 8 et 9 illustrent les propriétés de l'amylase bactérienne (40 000 unités A (ICC) par kg d'amidon ; concentration en amidon : 30 p. 100 ; durée : 1 heure) en fonction du pH et de la température.

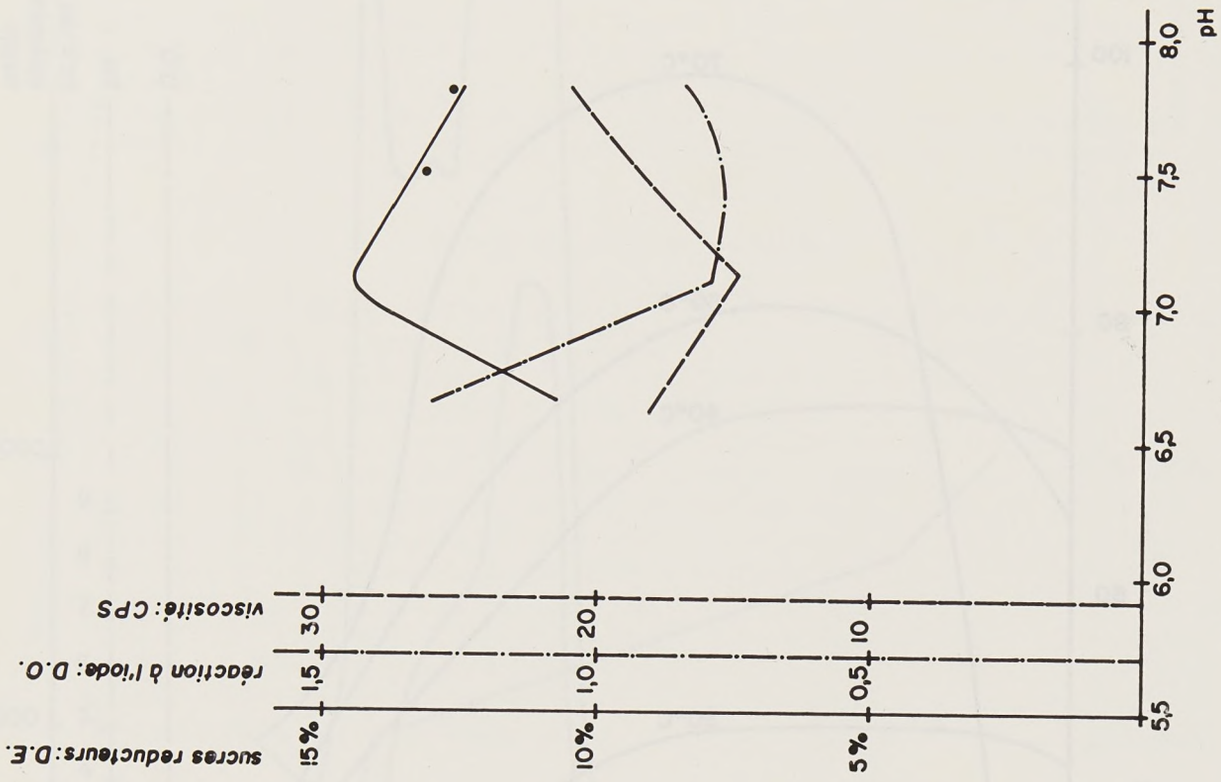


FIG. 6. — *Alpha-amylase bactérienne. Activité en fonction du pH en absence de calcium*

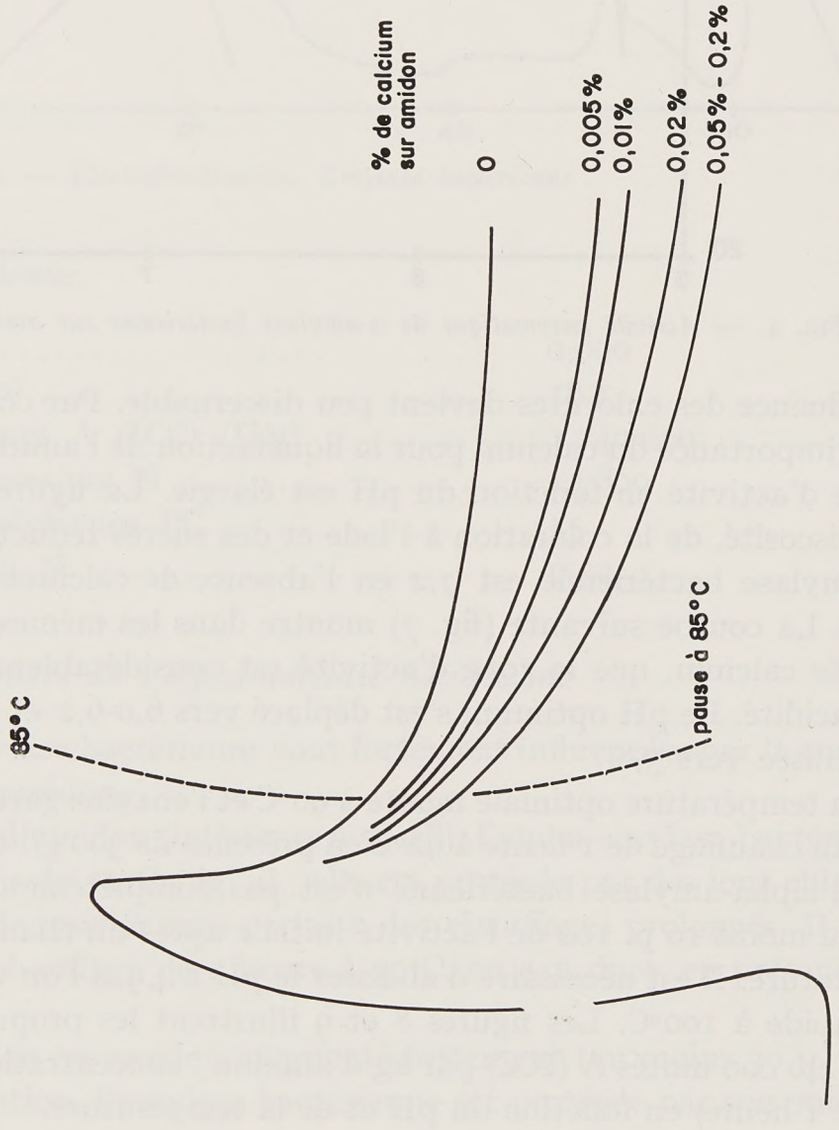


FIG. 5. — *Influence du calcium sur la liquéfaction de l'amidon*

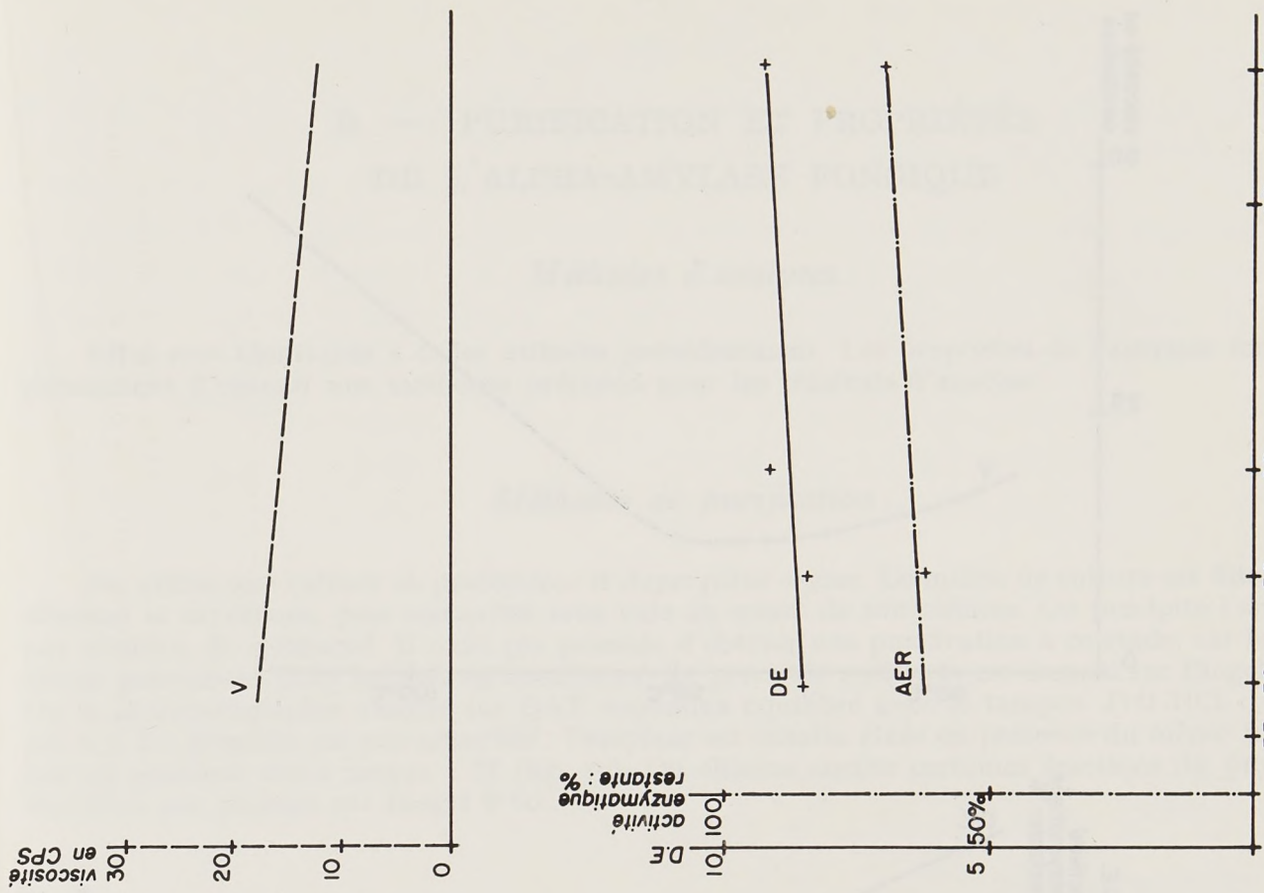


FIG. 8. — *Liquéfaction par injection de vapeur. Influence du pH*

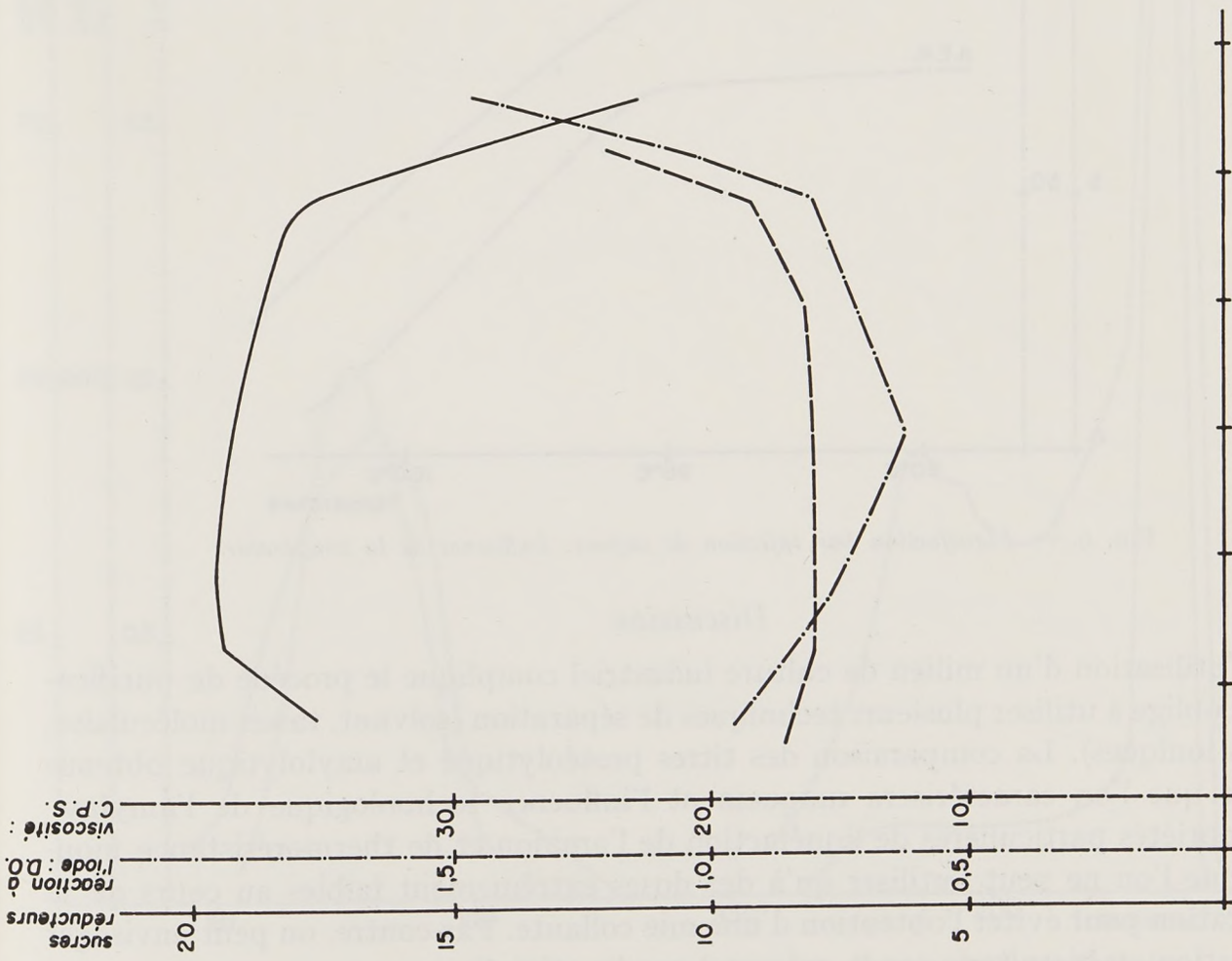


FIG. 7. — *Alpha-amylase bactérienne. Activité en fonction du pH en présence de calcium*

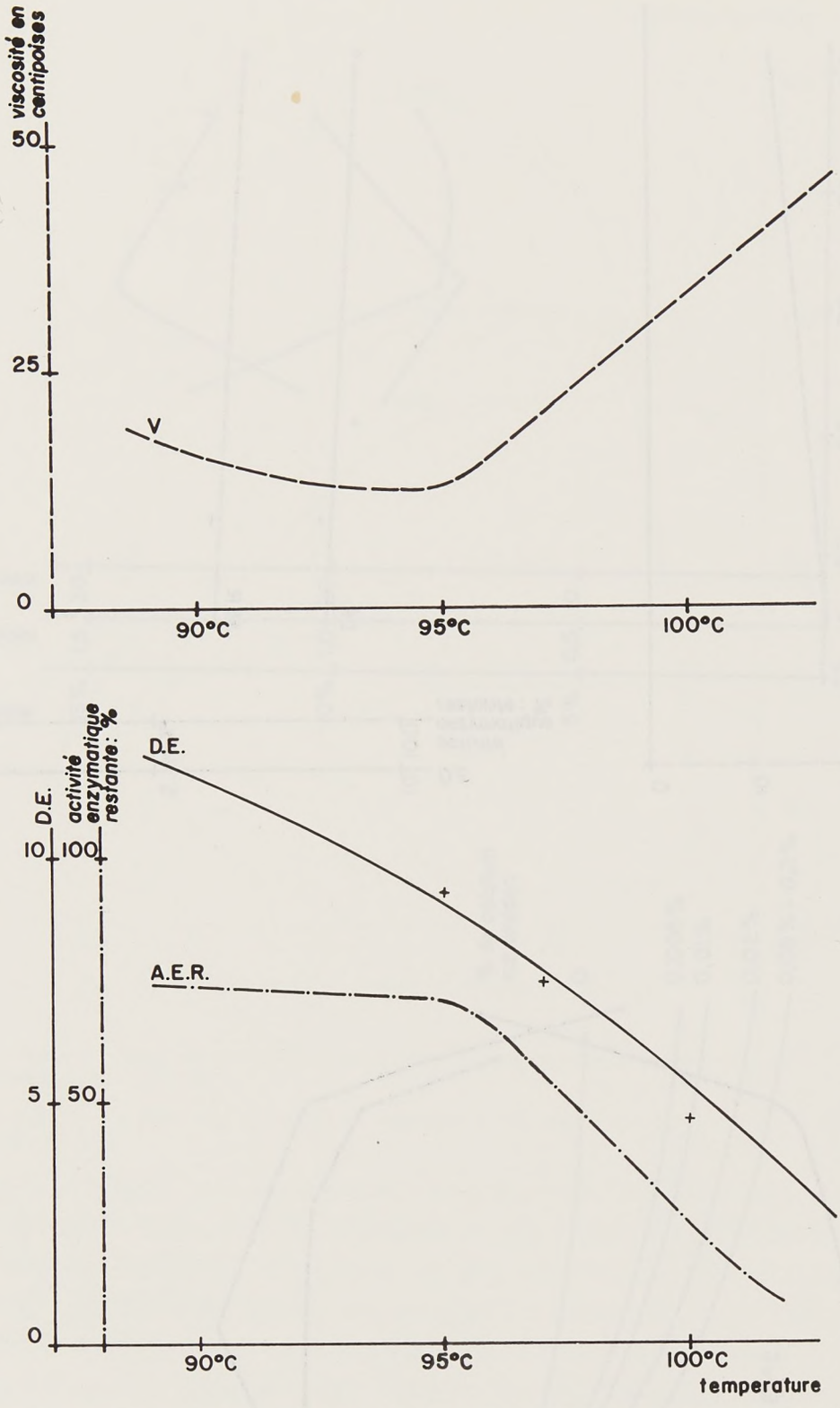


FIG. 9. — *Liquéfaction par injection de vapeur. Influence de la température*

Discussion

L'utilisation d'un milieu de culture industriel complique le procédé de purification et oblige à utiliser plusieurs techniques de séparation (solvant, tamis moléculaire, résines ioniques). La comparaison des titres protéolytique et amylolytique obtenus montre que l'on caractérisera uniquement l'influence technologique de l'amylase. Ses propriétés particulières de liquéfaction de l'amidon et de thermorésistance montrent que l'on ne peut l'utiliser qu'à des doses extrêmement faibles au cours de la panification pour éviter l'obtention d'une mie collante. Par contre, on peut envisager l'utilisation en biscuiterie car la cuisson à sec inactive l'enzyme.

B. — PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DE L'ALPHA-AMYLASE FONGIQUE

Méthodes d'analyses

Elles sont identiques à celles utilisées précédemment. Les propriétés de l'amylase fongique permettent d'obtenir une meilleure précision pour les résultats d'analyse.

Méthodes de purification

On utilise une culture en profondeur d'*Aspergillus oryzae*. Le milieu de culture est filtré pour éliminer le mycélium, puis concentré sous vide au quart de son volume. On précipite l'amylase par addition de méthanol. Il n'est pas possible d'obtenir une purification à ce stade, car les protéases précipitent dans les mêmes conditions. Le précipité redissous est dessalé sur Biogel P 10. On le chromatographie ensuite sur QAE Sephadex équilibré avec le tampon *Tris* HCl 0,01 M, pH 6,5. La protéase est peu adsorbée ; l'amylase est ensuite éluée en présence du même tampon par un gradient NaCl jusque 1 M (fig. 10). On élimine encore certaines fractions de protéines inactives par passage sur Biogel P 60.

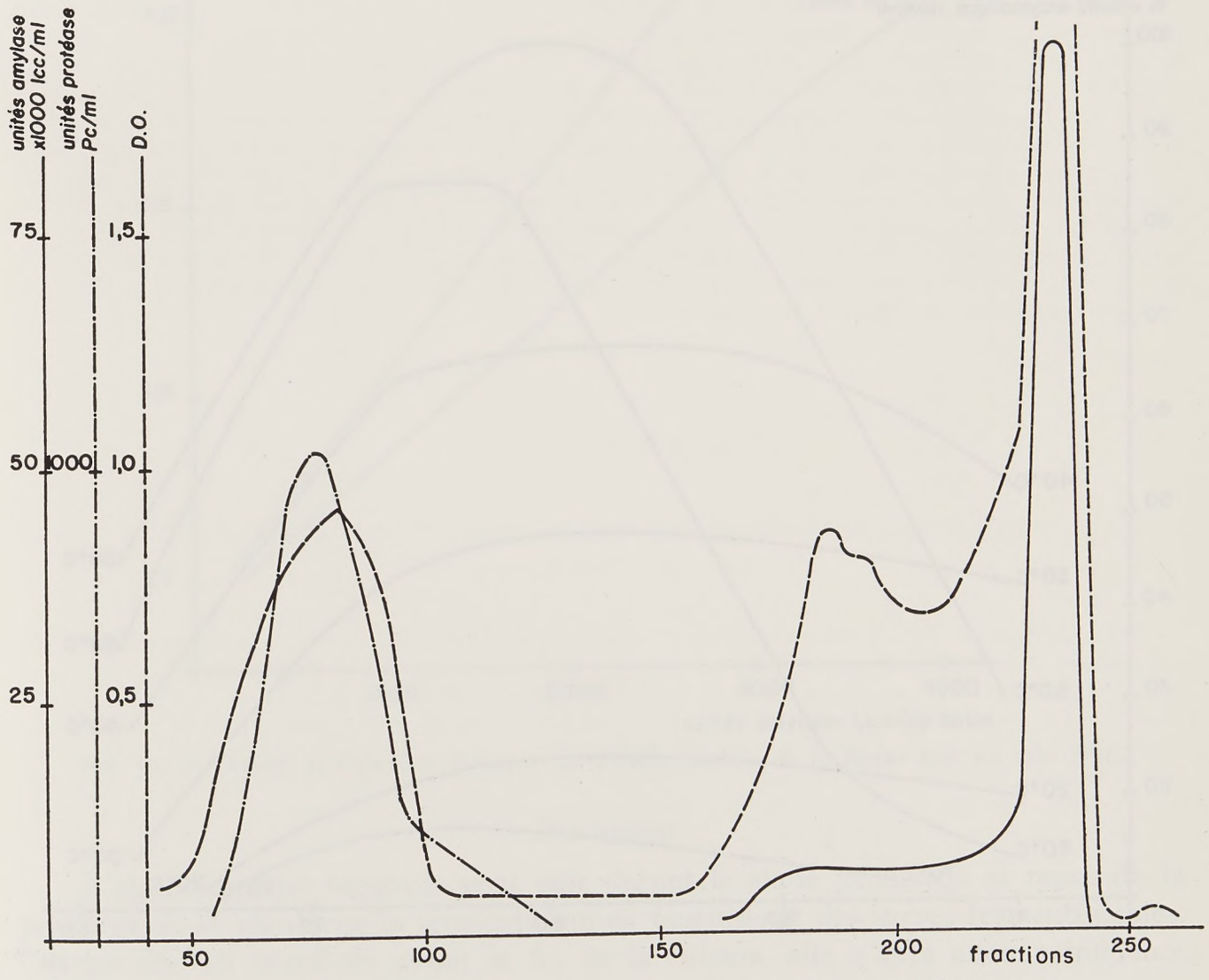


FIG. 10. — *Séparation amylase-protéase fongique* Asp. Oryzae *sur QAE Sephadex*

Résultats

L'électrophorèse montre que l'amylase est encore contaminée par une protéine dépourvue d'activité protéase ou amylase.

L'analyse fournit les résultats suivants :

Azote total (p. 100)	13,86
Cendres (p. 100)	3,96
Sucres (p. 100)	5,4
Activité amylase (ICC) (U/g)	$1,44 \times 10^6$
Activité amylase (U/g/mg N).....	10 400
Activité protéolytique (PC/g)	600

Propriétés de l'alpha-amylase fongique

Les propriétés de cette amylase ont été déterminées sur substrat amidon à la concentration de 2 p. 100 par dosage des sucres réducteurs. Le pH optimum est de 6,0 à la température de 50°C. La zone de pH s'élargit beaucoup lorsque la température diminue (fig. 11).

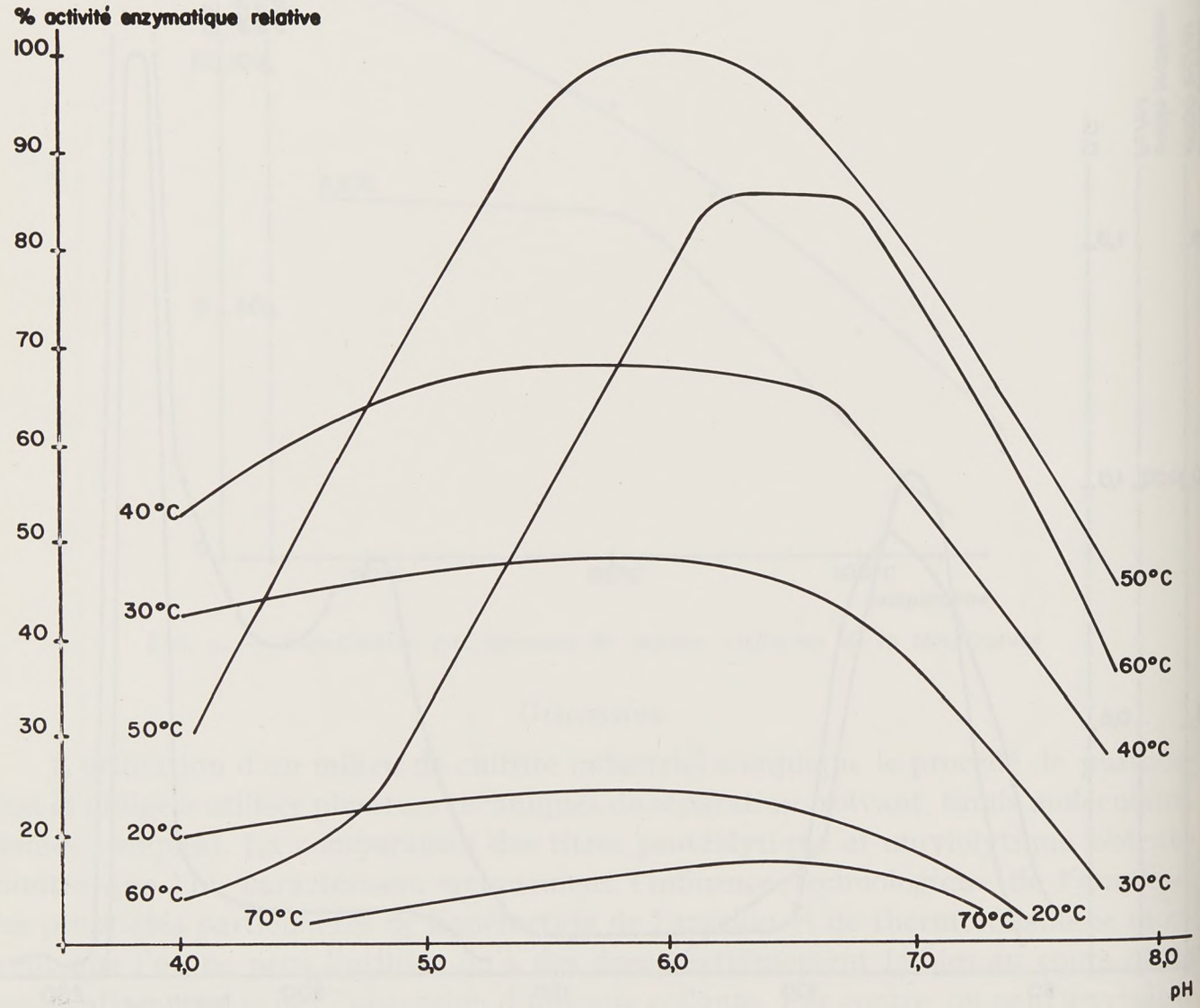


FIG. 11. — *Propriétés de l'amylase fongique*

Son activité à 70°C devient très faible. Comme cette température est peu supérieure aux températures de gélification des amidons, elle n'a donc qu'une zone d'activité très étroite lors du chauffage d'une solution d'amidon pour pouvoir le liquéfier complétement. Elle est inactivée à 75°C ; elle n'est pas influencée par les chlorures ou le calcium. Par contre, elle agit plus rapidement que l'amylase bactérienne sur l'amidon endommagé de la farine en provoquant la formation de sucres réducteurs. Le type d'activité semble influencé par la présence de ClNa qui augmente la quantité de sucres réducteurs formés (Weith, 1963), ce qui n'est pas le cas pour l'amylase du malt (fig. 12).

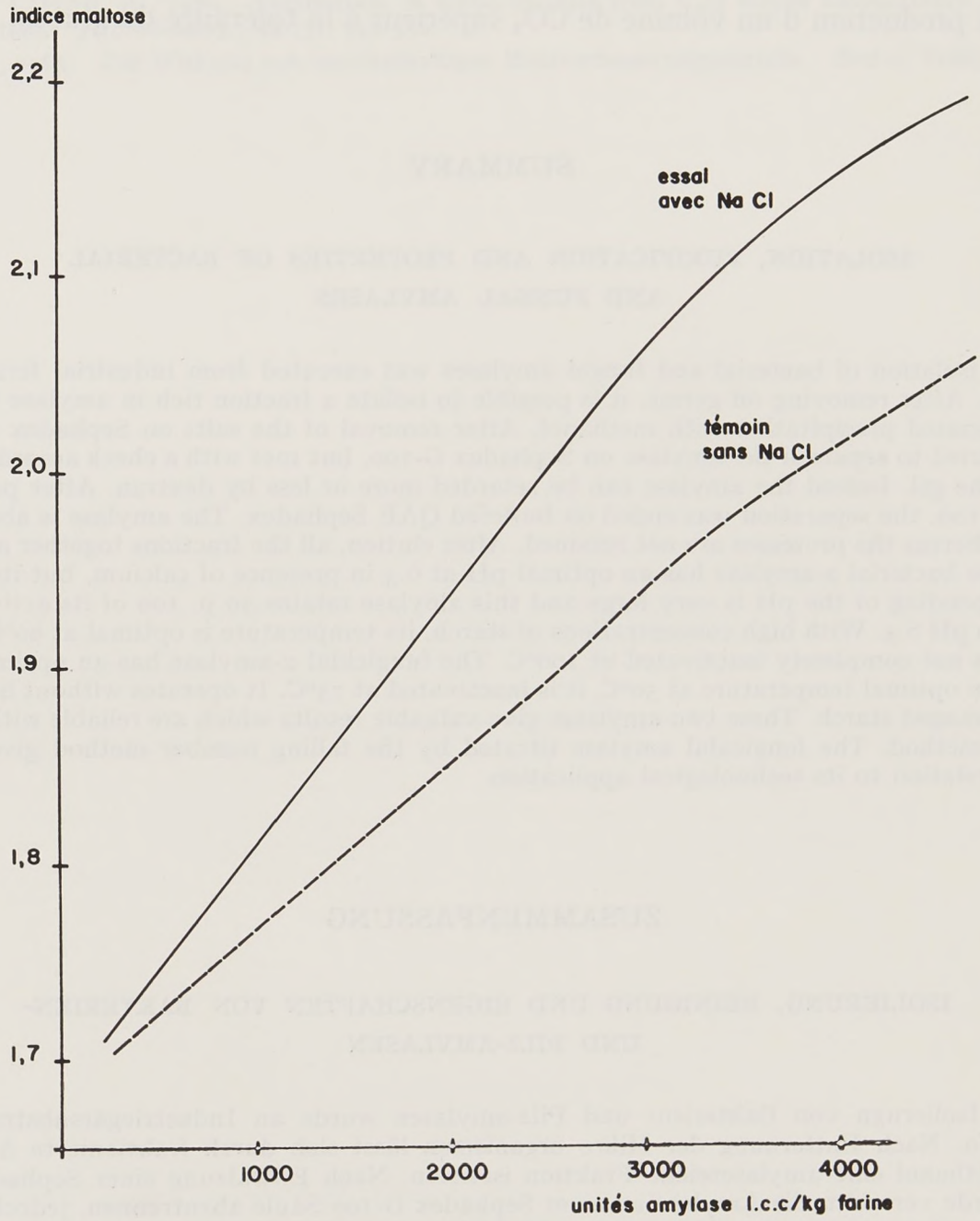


Fig. 12. — *Action de l'amylase fongique sur l'indice maltose de la farine avec ou sans NaCl*

Discussion

L'alpha-amylase fongique peut agir durant le stade pétrissage et repos de la panification et régularise la fermentation en fournissant des sucres fermentescibles. Comme elle est inactivée avant la fin de la cuisson, elle n'aura aucune influence défavorable sur les propriétés de la mie.

Son rôle en pratique est surtout de régulariser le taux de sucres fermentescibles, son dosage technique devra être basé sur ce phénomène (mesure de l'indice maltose par exemple). Les méthodes basées sur la liquéfaction de l'amidon (temps de chute d'Hagberg, amylographe) ne peuvent être admises. En effet, la température d'inactivation de l'amylase fongique est plus basse que celle des alpha-amylases des céréales et voisine de la température de gélification de la farine. L'emploi de ces méthodes conduit à l'utilisation de doses trop fortes dont le surdosage technologique est difficile à démontrer puisque son effet dextrinisant est limité par sa faible résistance thermique au cours de la cuisson et que son effet saccharifiant conduit en fermentation à la production d'un volume de CO_2 supérieur à la tolérance du gluten.

SUMMARY

ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF BACTERIAL AND FUNGAL AMYLASES

The isolation of bacterial and fungal amylases was executed from industrial fermentation mediums. After removing off germs, it is possible to isolate a fraction rich in amylase by means of fractionated precipitation with methanol. After removal of the salts on Sephadex G-25, the authors tried to separate the amylase on Sephadex G-100, but met with a check according to the high of the gel. Indeed the amylase can be retarded more or less by dextran. After passage on Biogel P 100, the separation was ended on buffered QAE Sephadex. The amylase is absorbed at pH 8.0 whereas the proteases are not retained. After elution, all the fractions together are freeze-dried. The bacterial α-amylase has an optimal pH at 6.3 in presence of calcium, but its activity curve depending of the pH is very large and this amylase retains 50 p. 100 of its activity from pH 5.8 to pH 8.5. With high concentrations of starch, its temperature is optimal at 90°C and the enzyme is not completely inactivated at 100°C. The fungicidal α-amylase has an optimal pH at 6.3 and an optimal temperature at 50°C, it is inactivated at 75°C. It operates without heating on wheat damaged starch. These two amylases give valuable results which are reliable with those of the ICC method. The fongicidal amylase titrated by the falling number method gives values without relation to its technological application.

ZUSAMMENFASSUNG

ISOLIERUNG, REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN VON BAKTERIEN- UND PILZ-AMYLASEN

Die Isolierugn von Bakterien- und Pilz-amylasen wurde an Industriegärsubstraten vorgenommen. Nach Entfernung der Mikro organismen lässt sich durch fraktionierte Ausfällung durch Methanol eine amylasereiche Fraktion isolieren. Nach Entsalzung einer Sephadex-G-25-Säule wurde versucht, die Amylase an einer Sephadex G-100 Säule abzutrennen, jedoch wurden Fehlschläge beobachtet, die mit der unterschiedlichen Gelhöhe in Zusammenhang gebracht wurden. Tatsächlich Kann die Amylase durch das Dextran mehr oder weniger aufgehalten werden. Nach einem Durchlauf an einer Biogel P-100-Säule wurde die Trennung an einer gepufferten Sephadex QAE — Säule beendet. Die Amylase wird bei einem pH von 8,0 absorbiert während die Proteasen nicht zurückgehalten werden.

Nach der Elution werden die Fraktionen gereinigt and lyophilisiert. Die bakterielle Alpha-amylase hat bein Anwesenheit von Calcium einen pH-Wert von 6,3 aber ihre Aktivitätskurve ist in bezug auf ihren pH-Wert sehr umfangreich und zwischen pH 5,8 und 8,5 behält sie 50 p. 100 ihrer Aktivität. Bei Anwesenheit von starken Stärkekonzentrationen erreicht sie ein Temperaturoptimum von 90°C und ist bei 100°C noch nicht vollständig inaktiviert.

Die pilz Alpha-amylase hat ein pH-Optimum von 6,0 und ein Temperaturoptimum von 50°C. Sie wird bei 75°C inaktiviert. Sie wirkt auf beschädigte Mehlstärke ohne Erhitzung. Beide Amylasen liefern gültige Ergebnisse und stimmen mit der ICC-Analysenmethode (Perten) überein. Die Bestimmung der Pilzlamylase mit Hilfe der Fallzeit-methode liefert Ergebnisse, die mit ihrer technologischen Anwendung in keinem Zusammenhang stehen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

FRATI L., CAPUTO A., 1970. Purification of alpha-amylase from C_3H mouse submaxillary gland by gel filtration. *J. Chromatog.*, **48** (3), 547-550.

WEITH L., 1963. Zur Wirkung von amylasehaltigen Mehlverbesserungsmitteln. *Brot u. Gebäck*, **16** (2), 22-26.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 141-150.

ISOLEMENT, PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DE DEUX AMYLASES D'ORIGINE FONGIQUE

A. BELLOC, J.-C. PALLA et J. VERRIER

Laboratoires de Recherches de la Société des Usines chimiques Rhône-Poulenc, 94400 Vitry sur Seine

RÉSUMÉ

Deux amylases originales ont été isolées à partir de cultures d'un *Streptomyces* et d'un *Penicillium* et purifiées par précipitations fractionnées successives par le méthanol, par le sulfate d'ammonium puis par l'isopropanol. Leurs propriétés biochimiques ont été ensuite étudiées.

L'amylase 26 750 R. P., enzyme de *Streptomyces species* NRRL 5 323, est active en milieu légèrement acide (pH optimal = 6,0), avec une activité pratiquement constante de 25°C à 60°C. Son activité est, au moins partiellement, de type α-amylase. Pour diminuer de façon nette la viscosité d'une pâte à base de farine de blé, il faut y ajouter une dose d'amylase 26 750 R. P. supérieure à 1 g/kg.

L'amylase 27 591 R. P., enzyme de *Penicillium expansum* NRRL 5 437, est active en milieu plus acide (pH optimal = 4,0). La température optimale pour son activité est de 54°C, mais l'enzyme supporte mal un chauffage à pH 4,0 à une température supérieure à 40°C. Cette activité est également de type α-amylase. Ajoutée à une pâte à base de farine de blé à une dose de 0,1 g/kg, l'amylase 27 591 R. P. en diminue nettement la viscosité (100 UB pour une pâte dont la viscosité maximale sans addition d'enzyme est de 590 unités Brabender).

INTRODUCTION

L'amidon étant, pondéralement, le constituant majeur de la farine de blé, il est normal que les amylases jouent un rôle important au cours du processus de panification et, d'une façon plus générale, dans les industries de cuisson des céréales. Cette action qui s'exerce à différents stades, à travers des mécanismes multiples, a fait l'objet de très nombreux travaux dont des analyses approfondies ont fait le point récemment (Reed, 1966 ; Mercier et Colas, 1967). L'hydrolyse du réseau

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 70-02-224-00-212-75-01 et 70-02-224-01-212-75-01) que nous remercions de son aide.

amylacé modifie profondément les propriétés rhéologiques des pâtes, en particulier leur viscosité. Parmi les produits de l'amylolyse, le maltose est important au moment de la fermentation puisqu'il fournit l'énergie nécessaire au développement des levures et les dextrines interviennent grandement sur la texture et le moelleux de la mie. Ces produits de réaction ont aussi un rôle sur la coloration de la croûte et sur la flaveur du pain.

Ce sont les amylases alpha et bêta intrinsèques de la farine qui sont normalement responsables de l'hydrolyse de l'amidon dans les pâtes. Mais si le taux de la β-amylase dans le blé est relativement constant, il existe des variations importantes de la teneur en α-amylase. Lorsque celle-ci est insuffisante (cas fréquent aux États-Unis, plus rare en France), il devient nécessaire d'y remédier par addition d'enzymes exogènes.

On utilisait autrefois à cet usage uniquement du malt d'orge ou de blé, mais depuis une vingtaine d'années aux États-Unis, plus récemment en Grande-Bretagne, en Allemagne et en U. R. S. S., s'est développé l'emploi d'α-amylases d'origine fongique (*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *A. arvamori*) ou bactérienne (*Bacillus subtilis*). L'action de ces α-amylases exogènes est fonction de leur sensibilité aux conditions de pH et de température, de la quantité de dextrines qu'elles sont susceptibles de former et de leur possibilité de pénétration et de diffusion au niveau des chaînes macro-moléculaires du substrat. Elle est donc très variable selon la nature et l'origine de ces enzymes (Beck, Johnson et Miller, 1957 ; Knight, 1960 ; Moro, Pomeranz et Shellenberger, 1963 ; Pomeranz et Shellenberger, 1963 ; Mamaril, Pomeranz et Shellenberger, 1964 ; Pomeranz, Rubenthaler et Finney, 1964 ; Shellenberger, McMasters et Pomeranz, 1966). L'α-amylase de *B. subtilis*, en particulier, qui n'est pas totalement inactivée au cours de la cuisson, peut, pendant le stockage du pain, en disloquant le réseau amylacé, retarder le rassissement dû à la rétrogradation de l'amidon.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant de rechercher des amylases originales pour étendre la gamme des produits offerts aux techniciens de la panification et de la biscuiterie. Nous avons ainsi pu isoler et purifier deux amylases d'origine fongique qui ont des caractères fort différents.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A. — *Techniques analytiques*

1. *Dosage de l'activité saccharifiante des amylases alpha et bêta.*

Cette détermination est effectuée par dosage des fonctions réductrices libérées à pH = 6,9 par hydrolyse des liaisons α-glucosidiques de l'amidon (Bernfeld, 1955) par une méthode manuelle ou automatique. Ces fonctions réductrices réagissent à l'ébullition avec l'acide dinitro-3,5 salicylique en faisant apparaître une coloration que l'on mesure à 540 nm. Avec des quantités assez faibles d'enzyme, on obtient des cinétiques linéaires pendant plusieurs minutes, la droite représentative passant par l'origine. La courbe de référence est établie à l'aide de maltose. L'unité d'amylase saccharifiante (US) est définie comme la quantité d'enzyme capable de faire apparaître 1 micro-équivalent de fonction réductrice (exprimée en maltose) par minute dans les conditions du dosage.

2. *Dosage de l'activité dextrinasique de l'amylase alpha.*

La méthode utilisée est celle que recommande l'Association internationale de Chimie céréalière. Le substrat est composé des dextrines limites obtenues en hydrolysant l'amidon à l'aide d'amylase bêta pure d'orge ou de pomme de terre. La mesure de l'activité est fondée sur la diminution en fonction du temps de la coloration à l'iode de ces dextrines limites à pH = 4,7 et à 30°C. Le logarithme de la densité optique lue à 575 nm décroît linéairement en fonction du temps. L'activité dextrinasique d'une solution est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$A = \frac{500\, f\, [\log(DO)t_1 - \log(DO)t_2]}{t_2 - t_1}$$

A est l'activité en unités dextrinasiques [UD] par unité de volume ;
500 est un coefficient arbitraire choisi pour la commodité d'expression des résultats ;
$(DO)t_1$ et $(DO)t_2$ sont les densités optiques mesurées aux temps t_1 et t_2 ;
$t_2 - t_1$ est la variation du temps d'hydrolyse exprimé en minutes ;
f est le facteur de dilution de la solution.

B. — *Micro-organismes*

Deux mille quatre-vingt-seize micro-organismes récemment isolés (*Streptomyces* et champignons filamenteux) ont été étudiés. Les 2 micro-organismes sélectionnés pour la production des 2 amylases originales sont un *Streptomyces* et un champignon filamenteux. Les souches ont été déposées au Northern regional Research Laboratory (Peoria, U. S. A.) sous les dénominations suivantes :

Streptomyces species DS 14 611 NRRL 5 323 (producteur de l'amylase 26 750 R. P.),
Penicillium expansum NRRL 5 437 (producteur de l'amylase 27 591 R. P.).

C. — *Conditions de culture*

La culture productrice de l'amylase 26 750 R. P. est effectuée dans un fermenteur de 800 l chargé avec les substances suivantes : farine de soja, 6 kg ; amidon partiellement hydrolysé, 8 kg ; phosphate monopotassique, 800 g ; sulfate de magnésium heptahydraté, 200 g ; eau de ville, complément pour 370 l. Le pH est ajusté à 7,0 puis on stérilise le milieu à 122°C pendant 40 minutes. Après refroidissement, on ensemence le bouillon ainsi obtenu (400 l à pH = 6,75) avec 40 l d'une culture produite en fermenteur de 170 l du *Streptomyces* NRRL 5 323. La culture est effectuée à 27°C pendant 163 heures, en agitant à l'aide d'une turbine tournant à 205 tr/mn et en aérant avec un volume d'air stérile de 20 m³/h. En fin de culture, le pH est de 8,40 et l'activité amylasique du moût atteint 4,5 US/ml.

La culture productrice de l'amylase 27 591 R. P. est effectuée dans des conditions voisines avec le milieu suivant : corn steep à 50 p. 100 d'extrait sec, 16 kg ; glucose monohydraté, 8 kg ; carbonate de calcium, 2 kg ; chlorure de sodium, 2 kg ; sulfate de magnésium heptahydraté, 400 g ; eau de ville, complément pour 370 l (pH ajusté à 7,6). Après stérilisation, on ensemence le bouillon obtenu (400 l à pH = 6,8) avec 40 l d'une culture en fermenteur de 170 l de *Penicillium expansum* NRRL 5 437.

La culture est effectuée à 27°C pendant 7 jours. A partir de la vingtième heure et pendant 20 heures, on ajoute stérilement une solution de glucose hydraté à 40 p. 100 à raison de 1 l/h. En fin d'addition de glucose, le pH est de 5,30. En fin de culture, le pH est de 8,30 et l'activité amylasique atteint 1 US/ml.

D. — *Isolement et purification des amylases*

Le tableau 1 résume le schéma opératoire utilisé pour l'isolement et la purification des 2 amylases.

E. — *Essais technologiques*

L'influence des amylases sur la viscosité d'une suspension de 80 g de farine (à 14 p. 100 d'humidité) dans 450 ml d'eau a été étudiée, en fonction du temps et de la température, à l'amylographe Brabender. La température initiale pour cette étude était de 25°C et croissait réguliè-

rement de 1°5C par minute. On détermine ainsi la température de début de gel (voisine de 62°C pour nos témoins), la température du gel maximal (voisine de 86°C pour nos témoins) et la viscosité maximale (voisine de 600 UB pour nos témoins).

TABLEAU I

Schéma opératoire pour l'isolement et la purification des amylases 26 750 R. P. et 27 591 R. P.

Suite des opérations	Conditions propres à chaque amylase	
	26 750 R. P.	27 591 R. P.
1. Filtration du bouillon	pH = 7,5	pH = 7,0
2. Concentration du filtrat	au 1/5 de son volume	au 1/8 de son volume
3. Dialyse	*pas de dialyse*	17 heures à + 4°C
4. Précipitation par le méthanol à — 20°C	fraction 50-75 p. 100	75 p. 100
5. Précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ à + 4°C	fraction 40-80 p. 100 de saturation	80 p. 100 de saturation
6. Dialyse	17 heures à + 4°C	17 heures à + 4°C
7. Précipitation par l'isopropanol à — 20°C	66 p. 100	60 p. 100
8. Séchage	2 mm Hg, 20°C	2 mm Hg, 20°C

RÉSULTATS

A. — *Rendement et purification*

Le tableau 2 indique le rendement d'extraction (grammes d'amylase purifiée extraite par litre de bouillon de culture) et les activités amylolytiques des préparations purifiées des 2 enzymes 26 750 R. P. et 27 591 R. P. comparées à celles de l'α-amylase pancréatique de porc cristallisée (produit Worthington biochemical Corporation).

TABLEAU 2

Rendement d'extraction. Activités enzymatiques des amylases 26 750 R. P. et 27 591 R. P. purifiées

Amylase étudiée	Rendement d'extraction g/l	Activités enzymatiques		
		Activité amylolytique		Activité protéolytique
		Saccharifiante US/g	Dextrinasique UD/g	
26 750 R. P.	0,18	7 850	590 000	inf. à 100 U/g
27 591 R. P.	0,21	2 600	810 000	inf. à 100 U/g
α-amylase pancréatique cristallisée		685 000	51 230 000	nulle

La purification a été poussée pour les 2 enzymes de façon à ce que les deux préparations purifiées soient pratiquement exemptes d'activité protéolytique, stade important pour l'application technologique envisagée.

B. — *Caractères enzymatiques*

1. *Activité saccharifiante en fonction du pH.*

L'activité saccharifiante des 2 amylases a été étudiée sur l'amidon à 25°C dans la zone de pH 3,0-9,0. Les milieux tampons employés étaient les suivants : tampon acétate 0,2 M (pH 3,0 à 5,0), tampon phosphate 0,02 M (pH 5,0 à 8,0), tampon borate 0,05 M (pH 8,0 à 9,0) (fig. 1). Les résultats montrent que cette activité n'est pas sensiblement influencée par la nature des anions présents dans le milieu réactionnel.

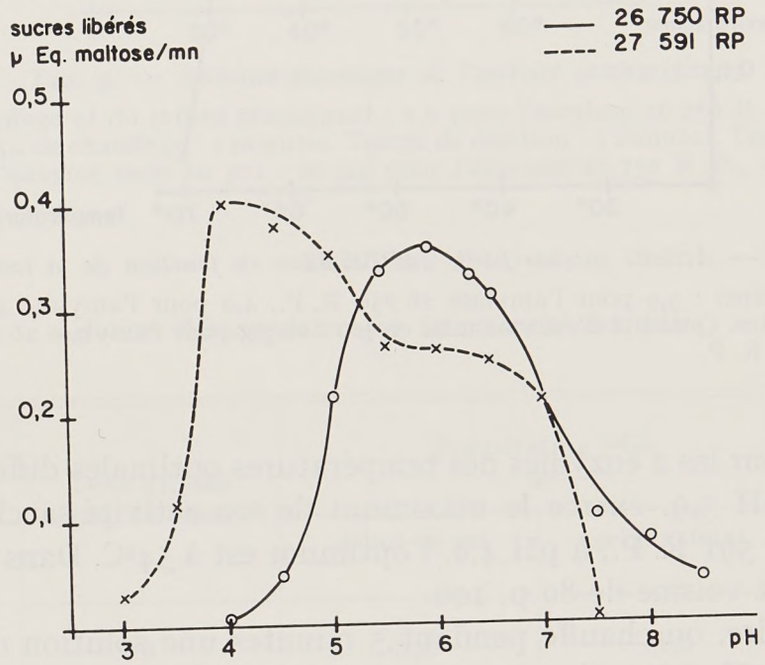


FIG. 1. — *Activité saccharifiante sur l'amidon en fonction du pH*

Tampon acétate 0,2 M de pH 3,0 à 5,0 ; tampon phosphate 0,02 M de pH 5,0 à 8,0 ; tampon borate 0,05 M de pH 8,0 à 9,0. Température de réaction : 25°C. Temps de réaction : 3 minutes. Quantité d'enzyme mise en jeu : 20 µg pour l'amylase 26 750 R. P., 150 µg pour l'amylase 27 591 R. P.

La valeur optimale du pH pour l'activité saccharifiante de l'amylase 26 750 R. P. est voisine de 5,9, l'enzyme gardant une activité supérieure à 80 p. 100 de son activité maximale entre les valeurs 5,2 et 6,7.

Pour l'activité saccharifiante de l'amylase 27 591 R. P., l'optimum se situe vers pH 4,0, mais la zone favorable est très dissymétrique par rapport à cette valeur, puisque l'enzyme exerce plus de 50 p. 100 de son activité maximale entre les valeurs 3,7 et 7,0 ; dans la zone 5,5 à 6,5 l'activité est pratiquement constante (voisine de 65 p. 100 de l'activité maximale).

2. *Activité saccharifiante en fonction de la température.*

L'activité saccharifiante des 2 amylases a été étudiée sur l'amidon à la valeur optimale du pH, à des températures variant de 25° à 75°C, avec un temps de réaction de 3 minutes (fig. 2).

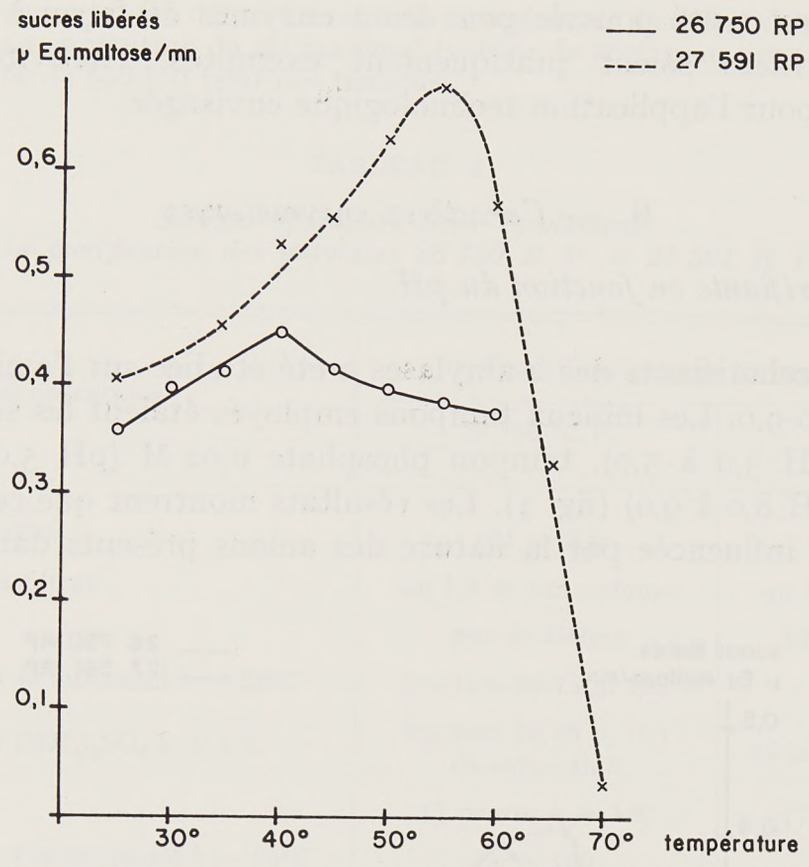


FIG. 2. — *Activité saccharifiante sur l'amidon en fonction de la température*

pH du milieu réactionnel : 5,9 pour l'amylase 26 750 R. P., 4,0 pour l'amylase 27 591 R. P. Temps de réaction : 3 minutes. Quantité d'enzyme mise en jeu : 20 µg pour l'amylase 26 750 R. P., 150 µg pour l'amylase 27 591 R. P.

On trouve pour les 2 enzymes des températures optimales différentes ; l'amylase 26 750 R. P., à pH 5,9, exerce le maximum de son activité saccharifiante à 40°C ; pour l'amylase 27 591 R. P., à pH 4,0, l'optimum est à 54°C. Dans les 2 cas, l'activité relative à 60°C est voisine de 80 p. 100.

Si, au contraire, on chauffe pendant 5 minutes une solution d'enzyme dans un tampon dont le pH est optimal pour l'activité de l'enzyme et si l'on détermine ensuite l'activité saccharifiante résiduelle, on constate que l'amylase 27 591 R. P. est plus thermolabile à pH 4,0 que l'amylase 26 750 R. P. à pH 5,9 ; les températures maximales pour lesquelles l'activité résiduelle est supérieure à 85 p. 100 sont respectivement 40° et 55°C (fig. 3).

3. *Activité dextrinasique.*

A 30°C et à pH 4,7, les 2 amylases ont une activité élevée sur les dextrines-limites (tabl. 2).

C. — *Action sur la viscosité des pâtes*

L'étude technologique des 2 amylases a été limitée jusqu'ici à l'examen, à l'amylographe Brabender, de leur pouvoir liquéfiant sur les suspensions de farine. Les résultats obtenus aux différentes doses des 2 enzymes sont rassemblés dans le tableau 3.

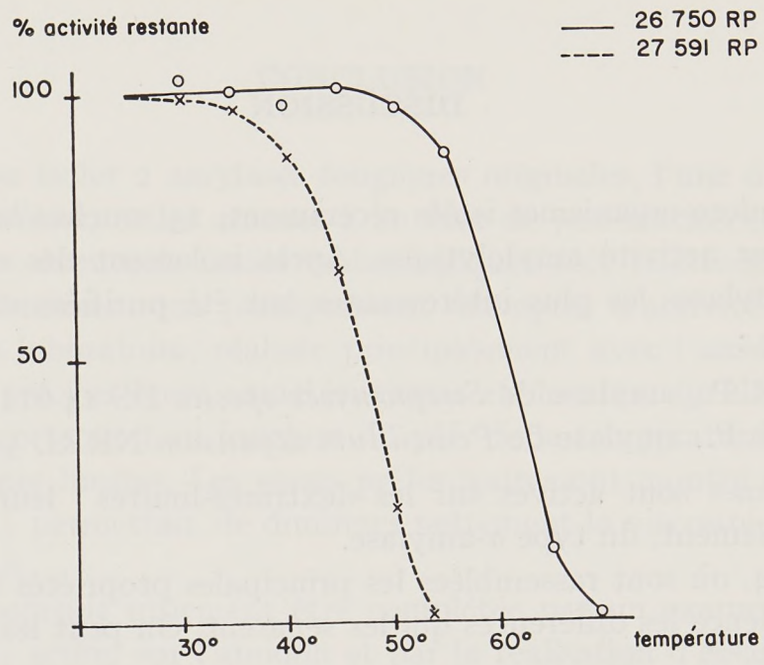


FIG. 3. — *Stabilité thermique de l'activité saccharifiante*

pH du milieu de chauffage et du milieu réactionnel : 5,9 pour l'amylase 26 750 R. P., 4,0 pour l'amylase 27 591 R. P. Temps de chauffage : 5 minutes. Temps de réaction : 3 minutes. Température de réaction : 25°C. Quantité d'enzyme mise en jeu : 20 µg pour l'amylase 26 750 R. P., 150 µg pour l'amylase 27 591 R. P.

TABLEAU 3

Action des amylases sur la viscosité des pâtes

Amylase étudiée	Dose utilisée g/kg de farine	Température (°C) de		Viscosité maximale UB
		début de gel	gel maximal	
26 750 R.P.	0	62,5	86,5	665
	0,1	62,5	87,0	670
	1	62,5	85,0	610
	5	67,0	79,0	465
	10	67,0	74,0	360
27 591 R.P.	0	62,0	86,0	590
	0,1	62,0	87,0	490
	1	62,0	88,0	280
	5			80

Dans nos conditions d'étude, l'activité de l'amylase 27 591 R. P. est nettement supérieure à celle de l'amylase 26 750 R. P. ; à la dose de 100 mg par kg de farine, l'enzyme 27 591 R. P. abaisse la viscosité de 100 UB (1) (sur 590 UB, viscosité du témoin) alors que l'amylase 26 750 R. P. employée à la dose de 1 g/kg n'abaisse cette viscosité que de 55 UB. Employée à des doses variant de 100 mg à 1 g/kg de farine, l'amylase 27 591 R. P. ne modifie ni la température de début de gel ni celle du gel maximal.

(1) UB : unité Brabender.

DISCUSSION

Sur 2 096 micro-organismes isolés récemment, 13 souches ont été sélectionnées en raison de leur activité amylolytique. Après isolement des enzymes correspondantes, les 2 amylases les plus intéressantes ont été purifiées et étudiées de façon plus approfondie :

— 26 750 R. P., amylase de *Streptomyces species* DS 14 611 NRRL 5 323.
— 27 591 R. P., amylase de *Penicillium expansum* NRRL 5 437.

Les 2 enzymes sont actives sur les dextrines-limites ; leur activité est donc, au moins partiellement, du type α-amylase.

Le tableau 4, où sont rassemblées les principales propriétés des 2 préparations, met bien en évidence les différences qui les séparent. On peut les caractériser ainsi :

26 750 R. P. : amylase active en milieu légèrement acide (optimum à 6,0), avec une activité pratiquement constante de 25°C à 60°C ;

27 591 R. P. : amylase active en milieu plus acide (optimum à 4,0), plus sensible aux variations de température (optimum à 54°C), ayant une activité α-amylase pure relativement plus marquée.

TABLEAU 4

Caractéristiques comparées des 2 amylases

	Amylase 26 750 R.P.	Amylase 27 591 R.P.
pH optimal	5,9	4,0
Température optimale	40°C	54°C
Activité saccharifiante	7 850 US/g	2 600 US/g
Activité dextrinasique	590 000 UD/g	810 000 UD/g
Action sur la viscosité des pâtes	très nette à 5 g/kg	très nette à 0,1 g/kg

L'addition de la préparation enzymatique 27 591 R. P. à une pâte à base de farine de blé en diminue la viscosité ; cet effet est très net dès la dose de 0,1 g/kg de farine ; il n'y a pratiquement pas d'action sur les températures de début de gélification et de gel maximal. L'action de l'enzyme 26 750 R. P. est beaucoup plus discrète, ne se manifestant de façon nette qu'au-delà de la dose de 1 g/kg.

Des essais complémentaires seraient nécessaires pour expliquer les raisons de la plus grande efficacité de l'enzyme 27 591 R. P. sur la viscosité des pâtes.

Il serait enfin très intéressant d'étudier l'influence des 2 amylases en panification ou en biscuiterie lors de l'emploi de farines hypo-amylasiques.

CONCLUSION

Nous avons pu isoler 2 amylases fongiques originales, l'une d'un *Streptomyces*, l'autre d'un *Penicillium*, et les amener à un état de purification suffisant pour que l'interprétation des éventuels essais technologiques soit relativement plus facile ; les préparations obtenues sont pratiquement exemptes d'activité protéolytique.

Une étude au laboratoire, réalisée principalement avec l'amidon comme substrat, a permis de préciser leurs caractéristiques et de noter qu'elles diffèrent entre elles par leur comportement en fonction du pH, de la température et par leur activité sur les dextrines limites. Les essais préliminaires ont montré que l'une d'entre elles (27 591 R. P.) permettait de diminuer nettement la viscosité d'une suspension de farine dans l'eau.

Cette étude pourrait utilement être complétée par un examen approfondi, au laboratoire, de leur action sur l'amidon et par la réalisation d'essais en panification pour préciser leur action technologique et la comparer à celle des amylases classiques d'*Aspergillus oryzae* et de *Bacillus subtilis*. Il serait intéressant, en effet, de pouvoir établir une corrélation entre l'activité enzymatique mesurée au laboratoire et l'activité observée au cours des essais technologiques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme Mancy, MM. Florent et Lunel (Laboratoires de Recherches de Vitry sur Seine de la S. U. C. R. P.) et MM. Achard et David (Laboratoires de Recherches de Saint-Fons de la S. U. C. R. P.) pour l'aide qu'ils nous ont apportée respectivement pour la préparation des enzymes et pour les essais technologiques.

SUMMARY

ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF TWO AMYLASES OF FUNGAL ORIGIN

Two original amylases were isolated and purified from cultures of micro-organisms : a *Streptomyces* (26 750 R. P.) for one and a filamentous fungus (27 591 R. P.) for the other. The two enzymes have a double effect on starch : saccharification and dextrinisation ; their behaviours are different, depending on temperature and pH. The activity of the first is maximal at 40°C and pH 5.9 and that of the second at 54°C and pH 4.0. On a wheat meal dough, the amylolytic activity of the enzyme 27 591 R. P., evaluated on Brabender amylograph, is very much higher than that of the enzyme 26 750 R. P.

ZUSAMMENFASSUNG

ISOLIERUNG, REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN VON ZWEI PILZAMYLASEN

Zwei spezielle Amylasen wurden von einem Streptomyces Kultur-stamm (26 750 R. P.) und einem Pilzstamm (27 591 R. P.) isoliert und gereinigt. Beide Enzyme haben auf Stärke eine doppette Wirkung : eine dextrinisierende und verzuckernde. Sie unterscheiden sich durch ihr vers-

chiedenes Verhalten in bezug auf Temperatur und pH. Die maximale Aktivität der ersteren liegt bei 40°C und einem pH 5,9 und die der zweiten bei einem pH von 4,0. Die amylolytische Aktivität des Enzyms 27 591 R. P., die an einem Mehl im Amylographen Brabender bestimmt wurde, liegt wesentlich höher als die des Enzyms 26 750 R. P.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Beck H., Johnson J. A., Miller B. S., 1957. Studies on the soluble dextrin fraction and sugar content of bread baked with alpha amylase from different sources. *Cereal Chem.*, **34**, 211-217.

Bernfeld P., 1955. In Colowick S. P., Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, vol. 1, 149-150. Academic Press, New York.

Knight R. A., 1960. Detection and estimation of fungal amylases in flour. *J. Sci. Food Agric.*, **11**, 54-60.

Mamaril F. P., Pomeranz Y., Shellenberger J. A., 1964. Contribution of α- and β-amylases to the production of sugars fermentable in panary fermentation. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 385-389.

Mercier C., Colas A., 1967. Les amylases en panification. *Ann. Nutr. Alim.*, **21**, B 299-340.

Moro M. S., Pomeranz Y., Shellenberger J. A., 1963. Starch-liquefying properties of crystalline α-amylases. *Cereal Chem.*, **40**, 442-450.

Pomeranz Y., Rubenthaler G. L., Finney K. F., 1964. Use of amyloglucosidase in bread making. *Food Technol.*, **18**, 138-140.

Pomeranz Y., Shellenberger J. A., 1963. Effects of α-amylases on pregelatinized starches, as measured by the amylograph. *J. Sci. Food Agric.*, **14**, 145-148.

Reed G., 1966. *Enzymes in food processing*, 221-238. Academic Press, New York.

Shellenberger J. A., McMasters M. M., Pomeranz Y., 1966. Wheat carbohydrates : their nature and functions in baking. *Baker's Digest*, **40**, 32-38.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 151-159.

INHIBITION DE L'ALPHA-AMYLASE DE BLÉ PAR L'ACIDE ASCORBIQUE ET PAR DES DÉRIVÉS DE L'ISOALLOXAZINE

J.-C. PALLA et J. VERRIER

Laboratoire de Recherches de la Société des Usines chimiques Rhône-Poulenc, 94400 Vitry sur Seine

RÉSUMÉ

Le procédé de purification de l'alpha-amylase de blé utilisée pour la recherche des inhibiteurs comporte les étapes suivantes : extraction durant 2 heures à 4°C de 1 kg de blé du Loiret broyé par une solution de chlorure de calcium (0,2 p. 100) puis filtration ; précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium et reprise de la fraction active (20-70 p. 100 saturation) par du tampon phosphate 0,02 M pH 6,9 ; inactivation thermique de l'activité bêta-amylasique par chauffage durant 15 minutes à 55°C ; filtration moléculaire sur gel de dextrane Sephadex G-100. Trois fractions F_1, F_2 et F_3 sont éluées. L'activité dextrinasique est purifiée environ 6 fois dans la fraction F_3 et 3 fois dans les fractions F_1 et F_2. La fraction F_3 ne possède presque pas d'activité saccharifiante. En revanche, le coefficient de purification pour cette activité est compris entre 6 et 10 fois dans les fractions F_1 et F_2.

L'acide ascorbique est un inhibiteur très puissant des activités saccharifiantes et dextrinasiques des trois fractions d'alpha-amylase préparées. Les concentrations inhibitrices 50 p. 100 des activités saccharifiantes sont comprises entre 2 et 10 mg par litre de milieu réactionnel et celles des activités dextrinasiques entre 34 et 70 mg par litre. La méthyl-10 isoalloxazine (23 833 R. P.) et la méthyl-10 nitro-7 isoalloxazine (23 577 R. P.) sont des inhibiteurs moins puissants que l'acide ascorbique (CI_{50} comprise entre 5 et 7,5 mg par litre pour les activités saccharifiantes et entre 120 et 170 mg par litre pour les activités dextrinasiques). Leur pouvoir inhibiteur est beaucoup moins affecté par chauffage à 70°C que celui de l'acide ascorbique.

INTRODUCTION

Les conditions optimales de panification requièrent la présence en quantité convenable dans les farines des amylases alpha et bêta (Mercier et Colas, 1967). Le taux de bêta-amylase dans les blés est assez constant et ne pose pas de problème

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 70-02-224-00-212-75-01 et 70-02-224-01-212-75-01) que nous remercions de son aide.

grave pour la technologie de la panification. Il n'en est pas de même en ce qui concerne l'alpha-amylase dont le taux est très variable selon l'origine du blé. Lorsque les blés utilisés pour préparer les farines panifiables sont pauvres en activité alpha-amylasique, l'optimum de panification peut être atteint grâce à des ajouts d'enzymes d'origine végétale, fongique ou bactérienne. Dans le cas contraire (observé fréquemment en France) de blés trop riches en activité alpha-amylasique, les conditions optimales de panification sont très difficiles à obtenir. Des essais d'appauvrissement en alpha-amylase des farines hyperamylasiques à l'aide de traitements physiques, comme la turboséparation, n'ont pas donné des résultats satisfaisants et les techniques les plus employées actuellement sont la diminution du taux d'extraction des farines, la prolongation du temps de stockage et surtout le tri des blés. Toutes ces méthodes apportent une légère amélioration de la qualité des farines, mais elles sont difficiles à mettre en œuvre et ne permettent pas d'utiliser tous les blés hyperamylasiques.

L'état d'avancement de la connaissance du mécanisme d'action des amylases au cours de la panification permet d'envisager actuellement la mise au point de méthodes biochimiques de régulation de l'activité alpha-amylasique dans la farine au cours de la cuisson. Le principe de ces méthodes repose sur l'inhibition ménagée de l'activité enzymatique par un inhibiteur permettant d'arrêter l'hydrolyse de l'amidon à un stade compatible avec la qualité des produits cuits. Différentes recherches réalisées dans cette optique ont montré qu'il est possible d'inhiber l'activité alpha-amylasique, mais les inhibiteurs essayés jusqu'à présent sont non alimentaires et ne peuvent être mélangés aux farines panifiables.

L'objet du présent travail a été de rechercher des inhibiteurs puissants de l'alpha-amylase de blé suffisamment peu toxiques pour qu'on puisse envisager leur emploi en panification. A cette fin, nous avons purifié de l'alpha-amylase de blé et étudié le pouvoir inhibiteur vis-à-vis de cette enzyme de 527 produits organiques divers. Cette étude nous a permis de montrer que l'acide ascorbique est un puissant inhibiteur de l'alpha-amylase de blé et de trouver des inhibiteurs originaux, dérivés de l'isoalloxazine.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Techniques analytiques

1. *Dosage de l'activité saccharifiante des amylases alpha et bêta.*

Cette détermination est réalisée à l'aide de la technique décrite par Bernfeld qui s'appuie sur le dosage des fonctions réductrices libérées à pH 6,9 par l'hydrolyse des liaisons α-glucosidiques de l'amidon (Bernfeld, 1955). Ces fonctions réductrices réagissent à l'ébullition avec l'acide dinitro-3,5 salicyclique en faisant apparaître une coloration qui est mesurée à 540 nm. Avec des quantités d'enzyme assez faibles, on obtient des cinétiques linéaires durant plusieurs minutes, la droite représentative passant par l'origine. La courbe de référence est établie à l'aide de maltose. L'unité amylasique est la quantité d'enzyme qui fait apparaître 1 micro-équivalent de fonction réductrice exprimée en maltose par minute à 25°C.

2. *Dosage de l'activité dextrinasique de l'amylase alpha.*

La méthode utilisée est celle que recommande l'Association internationale de Chimie céréalière. Le substrat est composé des dextrines limites obtenues en hydrolysant l'amidon à l'aide de bêta-amylase pure d'orge ou de pomme de terre. La mesure de l'activité est fondée sur la diminution en fonction du temps de la coloration à l'iode de ces dextrines limites à pH 4,7 et 30°C.

Le logarithme de la densité optique lue à 575 nm décroît linéairement en fonction du temps. L'activité alpha-amylasique d'une solution est calculée à l'aide de la formule suivante :

$$A = \frac{500f\,[\log (DO)\, t_1 - \log (DO)\, t_2]}{t_2 - t_1}$$

A est l'activité en unités alpha-amylasiques par unité de volume,
500 est un coefficient arbitraire choisi pour la commodité de l'expression des résultats,
$(DO)t_1$ et $(DO)t_2$ sont les densités optiques mesurées aux temps t_1 et t_2,
$t_2 - t_1$ est la variation du temps d'hydrolyse exprimée en minutes,
f est le facteur de dilution.

3. *Dosage des protéines.*

Les dosages de protéines sont réalisés à l'aide de la méthode de Lowry *et al.* (1951) en prenant comme protéine de référence l'ovalbumine cristallisée.

Détermination de la concentration inhibitrice 50 p. 100

Dans le cas de l'inhibition de l'activité saccharifiante, on met en présence 0,33 unité internationale et des quantités croissantes de produit dans un volume total de 1 ml. La concentration inhibitrice 50 p. 100 (CI_{50}) correspond au nombre de mg de produit par litre de milieu réactionnel qui inhibe 50 p. 100 de l'activité. Pour l'étude de l'inhibition de l'activité dextrinasique de l'alpha-amylase, nous avons utilisé un volume réactionnel de 4 ml renfermant environ 5 unités d'alpha-amylase.

RÉSULTATS

Purification de l'α-amylase de blé

Le procédé de préparation mis au point comprend 4 étapes que l'on peut décrire brièvement de la façon suivante : extraction durant 2 heures à 4°C de 1 kg de blé du Loiret (récoltes 1970-1971), broyé à l'aide d'un mixer ménager, par 4 litres d'une solu-

TABLEAU I

Purification de l'α-amylase de blé

Étapes de la purification		Activité saccharifiante			Activité dextrinasique		
		Activité totale (U)	Rendement en activité (%)	Activité spécifique (U/mg protéines)	Activité totale (U)	Rendement en activité (%)	Activité spécifique (U/mg protéines)
Extraction		199 000	100	18	22 840	100	2
Précipitation au sulfate d'ammonium		179 500	90	24	14 950	65	2
Inactivation de la bêta-amylase		96 000	48	27	14 200	62	4
Filtration moléculaire sur Sephadex G-100	Fraction F_1	19 900	10	110	2 470	10	6
	Fraction F_2	19 950	10	200	1 180	5	6
	Fraction F_3	3 200	1	6	5 880	25	11

tion de chlorure de calcium à 0,2 p. 100 puis filtration ; précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium et reprise de la fraction active (20-70 p. 100 saturation) par du tampon phosphate 0,02 M de pH 6,9 ; inactivation thermique de l'activité bêta-amylasique par chauffage de la solution enzymatique obtenue durant 15 minutes à 55°C ; filtration moléculaire de la solution enzymatique sur gel de dextrane Sephadex G-100. La colonne de gel a un diamètre de 2,5 cm et une hauteur de 90 cm. Le gel

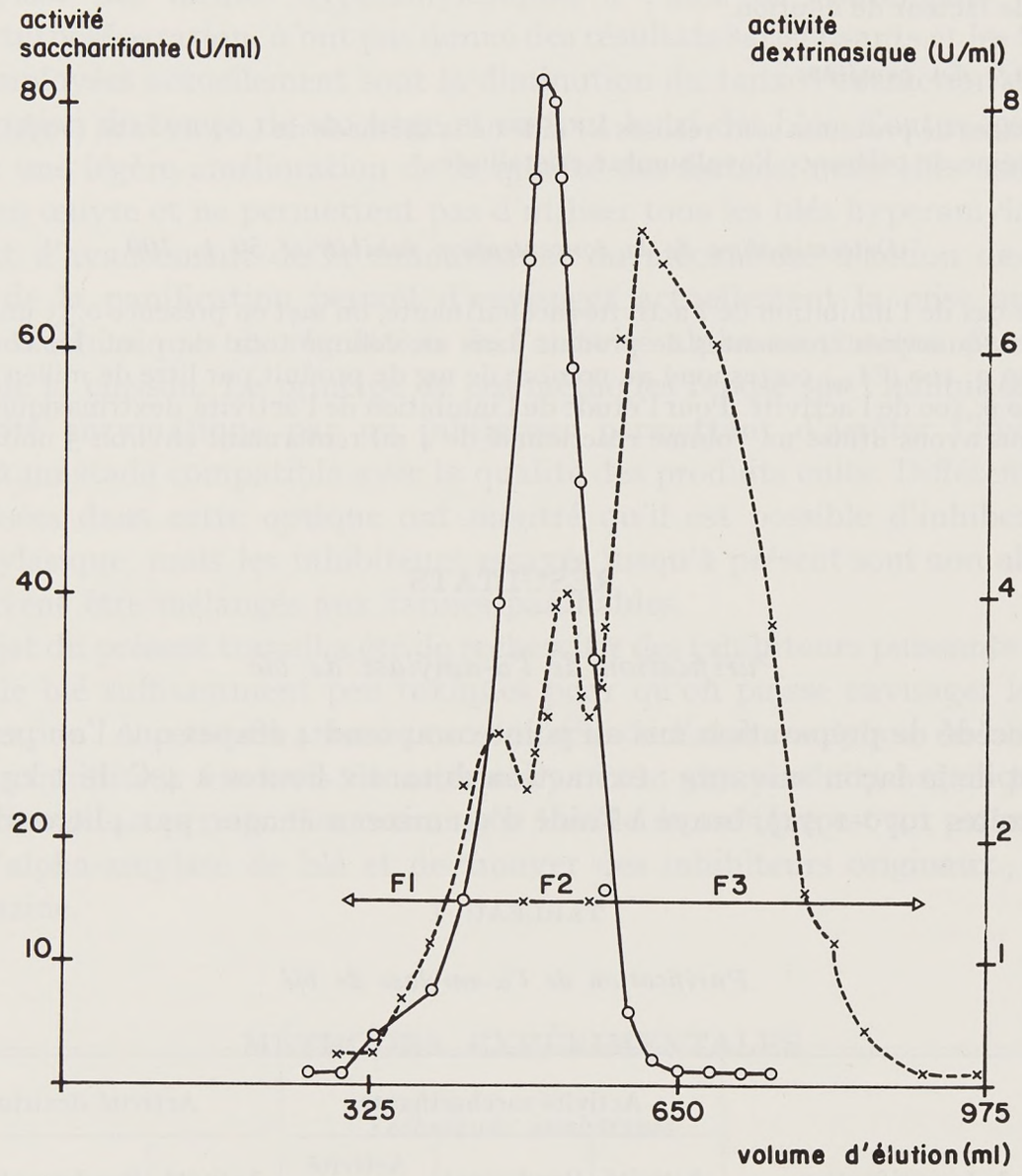


FIG. 1. — *Diagramme d'élution des trois fractions d'activité α-amylasique*
Abscisse : volume d'éluat en ml
Ordonnée : o——o activité saccharifiante (unités/ml d'éluat)
x----x activité dextrinisante (unités/ml d'éluat)

est équilibré à pH 6,9 dans du tampon phosphate 0,02 M. Avec une charge de colonne renfermant environ 15 000 unités saccharifiantes et 2 500 unités dextrinasiques, on obtient l'élution de 3 fractions d'alpha-amylase appelées F_1, F_2 et F_3 en réglant le débit de colonne à 20 ml par heure. Les résultats de l'étude de cette préparation sont groupés dans le tableau 1 et la figure 1.

Inhibition de l'α-amylase de blé par l'acide ascorbique et certains dérivés de l'isoalloxazine

1. *Étude du pouvoir inhibiteur.*

Parmi les 527 produits organiques étudiés, l'inhibiteur des activités saccharifiante et destrinasique le plus actif est l'acide ascorbique. L'acide isoascorbique est aussi actif que son isomère mais l'acide dihydroascorbique nettement moins. Plusieurs dérivés de l'isoalloxazine, voisins de la riboflavine et susceptibles de présenter une innocuité suffisante, sont actifs. Les deux produits les plus intéressants trouvés dans cette série sont :

— la méthyl-10 isoalloxazine, $C_{11}H_8N_4O_2$, 23 833 R. P.,
— la méthyl-10 nitro-7 isoalloxazine, $C_{11}H_7N_5O_4$, 23 577 R. P.

Le tableau 2 renferme les valeurs des concentrations inhibitrices 50 p. 100 en mg par litre de ces trois produits vis-à-vis des fractions F_1, F_2, F_3 et du mélange M de ces fractions.

TABLEAU 2

Inhibition des différentes fractions de l'α-amylase de blé par l'acide ascorbique et par des dérivés de l'isoalloxazine

Inhibiteur étudié	Concentration inhibitrice 50 p. 100 vis-à-vis :							
	de l'activité saccharifiante des fractions				de l'activité dextrinasique des fractions			
	F_1	F_2	F_3	M	F_1	F_2	F_3	M
Acide ascorbique	2	2	10	2	34	125	71	70
Méthyl-10 isoalloxazine (23 833 R. P.)	5	4,5	7,5	4,5	120	170	140	190
Méthyl-10 nitro-7 isoalloxazine (23 577 R. P.)	9	7,5	8	9,5	200	225	220	280

2. *Thermostabilité du pouvoir inhibiteur.*

Cette étude, dont les résultats sont indiqués dans le tableau 3, est réalisée dans les conditions suivantes : l'enzyme utilisée est l'alpha-amylase de la fraction M ; chaque inhibiteur est utilisé à la concentration qui à l'état non chauffé provoque 50 p. 100 d'inhibition ; le chauffage à 70°C durant 30 et 60 minutes est effectué sur des solutions d'inhibiteur à 0,1 g par litre qui sont ensuite ajoutées à la solution d'amidon en quantité suffisante pour obtenir dans le milieu réactionnel la CI_{50} théorique ; l'enzyme est ajoutée au mélange amidon-inhibiteur à raison de 0,33 U/ml (inhibition de l'activité saccharifiante) ou de 1,25 U/ml (inhibition de l'activité dextrinasique).

TABLEAU 3

Thermostabilité des inhibiteurs de l'α-amylase de blé
(acide ascorbique et dérivés de l'isoalloxazine)

Inhibiteur utilisé	Taux d'inhibition de l'activité saccharifiante en présence de l'inhibiteur (%)			Taux d'inhibition de l'activité dextrinasique en présence de l'inhibiteur (%)		
	Non chauffé	Chauffé		Non chauffé	Chauffé	
		30 mn à 70°C	60 mn à 70°C		30 mn à 70°C	60 mn à 70°C
Acide ascorbique	50	36	0	50	16	10
Méthyl-10 isoalloxazine (23 833 R. P.)	50	60	22	50	26	16
Méthyl-10 nitro-7 isoalloxazine (23 577 R. P.)	50	48	37	50	48	34

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Les deux techniques de dosage de l'activité amylasique employées permettent de discerner la présence d'alpha et de bêta amylases dans l'extrait brut préparé à partir du blé broyé. L'activité dextrinasique de cet extrait est faible par rapport à l'activité saccharifiante ; cette observation rejoint celle faite par Guilbot et Drapron (1963) selon laquelle il existe peu d'alpha-amylase dans le grain de blé non germé. Une part importante de l'activité saccharifiante est due à la présence d'activité bêta-amylasique. L'étape de précipitation au sulfate d'ammonium n'apporte pas de purification des activités, mais elle permet de concentrer cinq fois l'extrait brut. La différence de stabilité thermique des alpha et bêta-amylases (Kruger et Tkachuk, 1968) permet dans certaines conditions d'inactiver la bêta-amylase de blé sans altérer l'activité alpha-amylasique. Une étude de l'influence de la température sur les activités saccharifiantes et dextrinasiques de l'extrait sulfate d'ammonium a montré que la température la plus intéressante est 55°C. Un chauffage de 15 minutes suffit pour inactiver 42 p. 100 de l'activité saccharifiante alors que l'activité dextrinasique n'est pas altérée jusqu'au temps de chauffage 120 minutes. Entre les temps de chauffage 15 minutes et 40 minutes, l'activité saccharifiante ne change pas. Elle décroît à partir de 40 minutes pour atteindre 15 p. 100 de sa valeur initiale au temps 120 minutes.

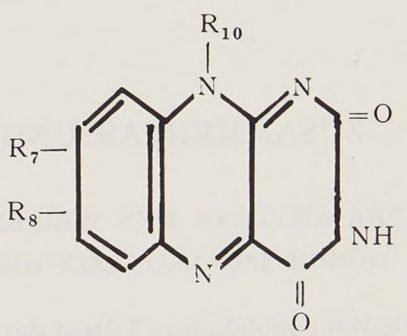
Il ressort des résultats groupés dans le tableau 1 et la figure 1 que le procédé de purification mis au point permet d'obtenir trois fractions d'alpha-amylase de blé dans un état de pureté suffisant pour la recherche et l'étude d'inhibiteurs. La fraction

F_3, caractérisée par un coefficient d'enrichissement en activité dextrinasique voisin de 6 fois, possède une activité saccharifiante très faible par rapport à l'activité saccharifiante de l'ensemble des trois fractions et, *a fortiori*, par rapport à celle de l'extrait brut ; on peut donc considérer que cette fraction F_3, représentative du quart de l'activité dextrinasique de l'extrait brut, renferme l'activité alpha-amylasique la plus typique présente dans le blé. En ce qui concerne les fractions F_1 et F_2, les caractéristiques respectives des activités saccharifiante et dextrinasique qu'elles contiennent sont très voisines. Le coefficient d'enrichissement en activité dextrinasique n'est que de 3 fois, mais en revanche celui de leur activité saccharifiante est compris entre 6 et 10 fois.

Les résultats du tableau 2 montrent que l'acide ascorbique est un inhibiteur puissant des activités saccharifiante et dextrinasique de l'alpha-amylase de blé purifiée et confirment ainsi l'hypothèse que CARTER et HUTCHINSON (1965) ont faite en s'appuyant uniquement sur des considérations d'ordre technologique. Cette vitamine étant utilisée couramment en panification, on peut se demander pour quelles raisons elle n'exerce qu'une influence réduite au cours de la cuisson. Deux hypothèses peuvent être avancées à ce sujet. La première est que l'acide ascorbique est entraîné dans une chaîne métabolique au début de la cuisson, ce qui l'empêche d'agir en tant qu'inhibiteur d'amylase. La seconde est que le traitement thermique détruit rapidement son pouvoir inhibiteur. Les résultats portés dans le tableau 3 indiquent en effet que le pouvoir inhibiteur de l'acide ascorbique est instable à la chaleur.

TABLEAU 4

Formule développée des dérivés de l'isoalloxazine cités



Produit	—R_7	—R_8	—R_{10}
Riboflavine	—CH_3	—CH_3	—$CH_2(CHOH)_3CH_2OH$
23 577 R. P.	—NO_2	—H	—CH_3
23 833 R. P.	—H	—H	—CH_3

Les deux dérivés de l'isoalloxazine proches de la riboflavine étudiés (tabl. 4) ont un pouvoir inhibiteur intéressant. Ils sont moins actifs que l'acide ascorbique, mais ils ont l'avantage d'être thermostables. En effet, alors que le pouvoir inhibiteur des solutions d'acide ascorbique disparaît complètement si on les chauffe durant

60 minutes à 70°C, celui de ces produits est beaucoup moins altéré. Une solution envisageable pour pallier l'effet réduit de l'acide ascorbique en panification est l'emploi du 23 833 R. P. ou du 23 577 R. P. en présence ou en l'absence de l'acide ascorbique.

CONCLUSION

L'acide ascorbique, la méthyl-10 isoalloxazine (23 833 R. P.) et la méthyl-10 nitro-7 isoalloxazine (23 577 R. P.) inhibent très nettement l'activité de trois fractions d'alpha-amylase de blé purifiée à partir de blé du Loiret. Le pouvoir inhibiteur de l'acide ascorbique étant plus thermolabile que ceux des dérivés de l'isoalloxazine, il semble envisageable d'utiliser ces produits dans la mesure où leur innocuité le permettrait pour pallier l'effet limité de l'acide ascorbique au cours de la panification des farines hyperamylasiques.

SUMMARY

WHEAT α-AMYLASE INHIBITION BY ASCORBIC ACID AND ISOALLOXAZINE DERIVATIVES

The molecular filtration on Sephadex G-100 of the total α-amylasic activity extracted from wheat of Loiret and cleaned by fractionnated purification with ammonium sulfate and heat treatment, shows the presence of 3 different enzymatic fractions. Ascorbic acid, methyl-10 isoalloxazine (23 833 R. P.), methyl-10 nitro-7 isoalloxazine (23 577 R. P.) are strong inhitors of these three enzymatic fractions. The ascorbic acid inhitory power is higher than that of isoalloxazine derivatives, but the later have an higher thermic stability.

ZUSAMMENFASSUNG

INAKTIVIERUNG DER ALPHA-AMYLASE DES WEIZENS DURCH ASCORBINSÄURE UND DURCH ISOALLOXAZIN-DERIVATE

Das über Sephadex G-100 erhaltene molekulare Filtrat der gesamten Alpha-amylase-aktivität die aus einem Loiret-Weizen extrahiert und durch fraktionierte Ausfällung durch Ammoniumsulfat und vorsichtiger Hitzebehandlung gereinigt wurde, enthüllt die Anwes enheit von drei verschiedenen enzymatischen Fraktionen. Ascorbinsäure, Methyl-10 Isoalloxazin (23 833 R. P.) und Methyl-10 nitro-7 Isoalloxazin (23 577 R. P.) sind drei starke Inhibitoren dieser drei Fraktionen. Das Inaktivierungsvermögen der Ascorbinsäure ist stärker als das der Isoalloxazinderivate, jedoch besitzen die Letzteren eine grössere Wärmestabilität als die Ascorbinsäure.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Association internationale de Chimie céréalière. Méthode colorimétrique pour la détermination de l'activité alpha-amylasique. *I. C. C. Standard*, n° 108, 1-9.

Bernfeld P., 1955. In Colowick S. P., Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, vol. 1, 149-158. Academic Press, New York.

CARTER J., HUTCHINSON J. B., 1965. The inhibition of wheat α-amylase by ascorbic acid and phosphate. *Chem. Ind.*, **42**, 1765-1766.

GUILBOT A., DRAPRON R., 1963. Évolution de l'activité alpha-amylasique du grain de blé au cours de sa maturation. Influence des radiations lumineuses. *Ann. Physiol. vég.*, **5** (1), 5-18.

KRUGER J. E., TKACHUK R., 1969. Wheat α-amylase. Isolation. *Cereal. Chem.*, **46**, 219-226.

LOWRY O. H., ROSEBROUGH N. J., FARR A. L., RANDALL R. J., 1951 . Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

MERCIER C., COLAS A., 1967. Les amylases en panification. *Ann. Nutr. Alim.*, **21**, B 299-B 340.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 161-174.

COMPARAISON DE L'ACTION DES ALPHA-AMYLASES BACTÉRIENNE, FONGIQUE ET DE MALT D'ORGE EN PANIFICATION

M. BERGER et P. GRANDVOINNET

avec la collaboration technique de Jacqueline Sennedot, R. Courtadon et A. S. Seck

Grands Moulins de Pantin,
62, rue du Louvre,
75002 Paris

RÉSUMÉ

L'étude comparative, à même nombre d'unités SKB, de l'activité dextrinisante d'alpha-amylases d'origines bactérienne, fongique et de malt d'orge a permis de mettre en évidence à l'aide de l'appareil de Hagberg des « coefficients d'activité » très différents entre ces trois enzymes. Un mode de calcul pour déterminer l'activité de ces enzymes en mélange est également proposé.

Des essais de panification effectués à même indice de chute, il ressort que l'utilisation des enzymes fongique et de malt d'orge est préférable à celle d'enzyme bactérienne beaucoup trop active. La supériorité de mélanges d'enzymes n'a pu être mise en évidence.

INTRODUCTION

L'obtention d'un pain développé et sapide dépend du déroulement de la fermentation panaire. Celle-ci est conditionnée en panification française par le pouvoir amylolytique des farines employées. Comme la teneur en bêta-amylase est à peu près constante, quelles que soient les variétés de blé ou les années de récolte, ce sont les variations de la teneur en alpha-amylase qui jouent le rôle le plus important. Par leurs activités saccharifiante et dextrinisante, les alpha-amylases concourent à la formation de sucres qui seront utilisés par la levure. Elles participent dans un deuxième stade à l'évolution de la gélification de l'amidon au cours de la cuisson.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 68-01-269-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

Jusqu'à présent, la pratique consiste en année hypodiastasique à ajouter du malt de blé ou d'orge dans la farine ou en panification pour obtenir un pouvoir amylasique suffisant. En année hyperdiastasique, des modifications du processus de fermentation permettent de limiter les effets d'un excès d'alpha-amylase.

De nombreux pays incorporent au cours de la panification des préparations d'alpha-amylases d'origine bactérienne ou fongique. Ces produits ont l'avantage de ne contenir qu'un seul type d'enzyme, ce qui permet d'ajuster leur incorporation de façon plus simple. Il est donc intéressant d'examiner l'influence de telles préparations en panification française.

L'étude que nous avons entreprise sur ce sujet comprend trois parties.

Tout d'abord, nous allons examiner parmi les méthodes rapides existant dans les industries des céréales celles qui peuvent le plus facilement permettre de doser l'action d'alpha-amylases de diverses origines. L'appareil de Hagberg mesurant l'indice de chute, donc l'activité dextrinisante des alpha-amylases, nous a semblé le plus propre à mener ce travail. Puis, dans le prolongement des résultats obtenus, nous étudierons l'action de doses diverses de préparations alpha-amylasiques au cours de la panification. La conduite de la panification et le résultat final seront étudiés de diverses manières. Les résultats nous amènerons à porter un jugement sur l'intérêt de telle alpha-amylase comparée à telle autre. Enfin, il nous a semblé intéressant de définir une méthode d'identification des préparations amylasiques bactérienne ou fongique. Cette méthode semi-quantitative peut rendre des grands services dans la pratique de l'incorporation de mélanges de ces alpha-amylases.

A. — ÉTUDE DE L'ACTIVITÉ DEXTRINISANTE D'ALPHA-AMYLASES D'ORIGINES DIFFÉRENTES A L'AIDE DE L'APPAREIL DE HAGBERG

Matériels et méthodes

1. *Matériels.*

— Appareil de Hagberg ;
— Substrat : farine de blé tendre hypodiastasique :
— Enzymes
  - extrait de malt d'orge fourni par la Sté Jacquemaire sous la dénomination commerciale de Cristomalt et titrant 50 unités SKB/g (méthode ICC nº 108-1962) ;
  - alpha-amylase fongique F 25 nº 253 extraite d'*Aspergillus oryzae* et titrant 5385 unités SKB/g ;
  - alpha-amylase bactérienne B 25 nº 109 extraite de *Bacillus subtilis* et titrant 3220 unités SKB/g.

2. *Méthodes.*

a) La détermination de l'activité alpha-amylasique de chaque préparation enzymatique a été effectuée selon la méthode ICC nº 108-1962. Les solutions enzymatiques n'ont pas été utilisées au-delà d'un délai de conservation de 4 heures.

b) Les déterminations de l'indice de chute mesurant l'activité alpha-amylasique de chaque préparation enzymatique ont été effectuées suivant la méthode ICC nº 107 ; des quantités connues d'enzymes de différentes origines ont été ajoutées seules ou en mélange par l'intermédiaire de 25 ml d'eau.

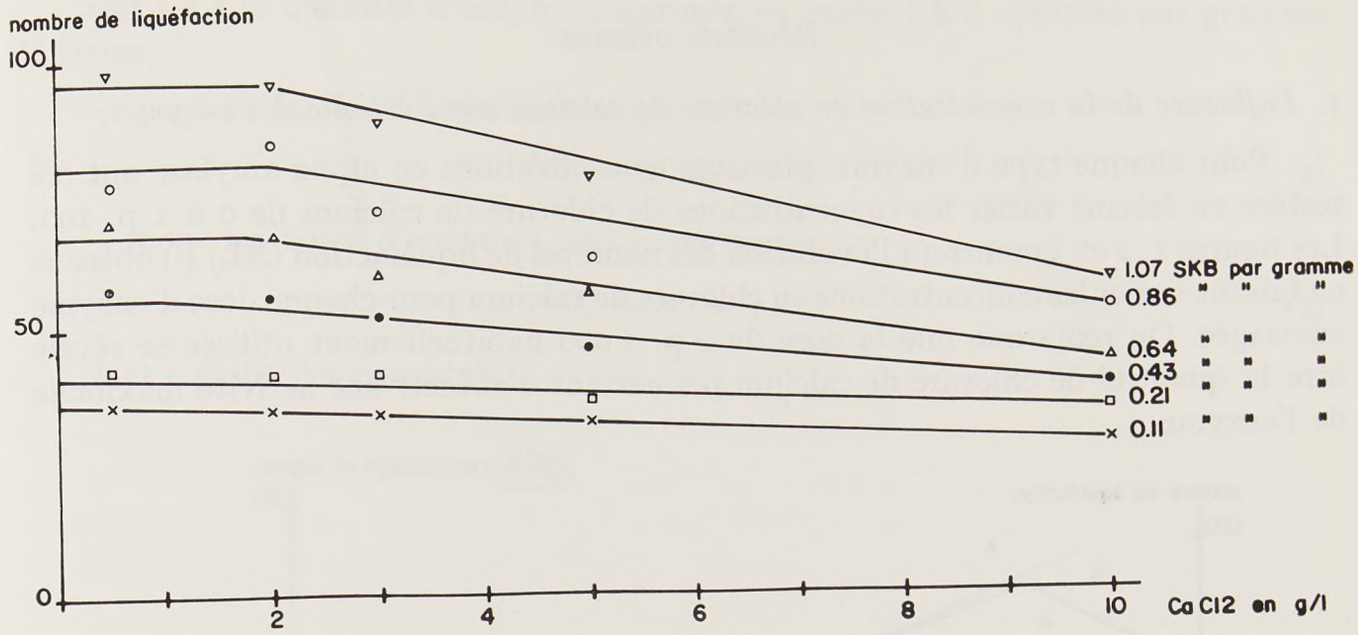


FIG. 1. — *Influence du chlorure de calcium sur l'activité du cristomalt*

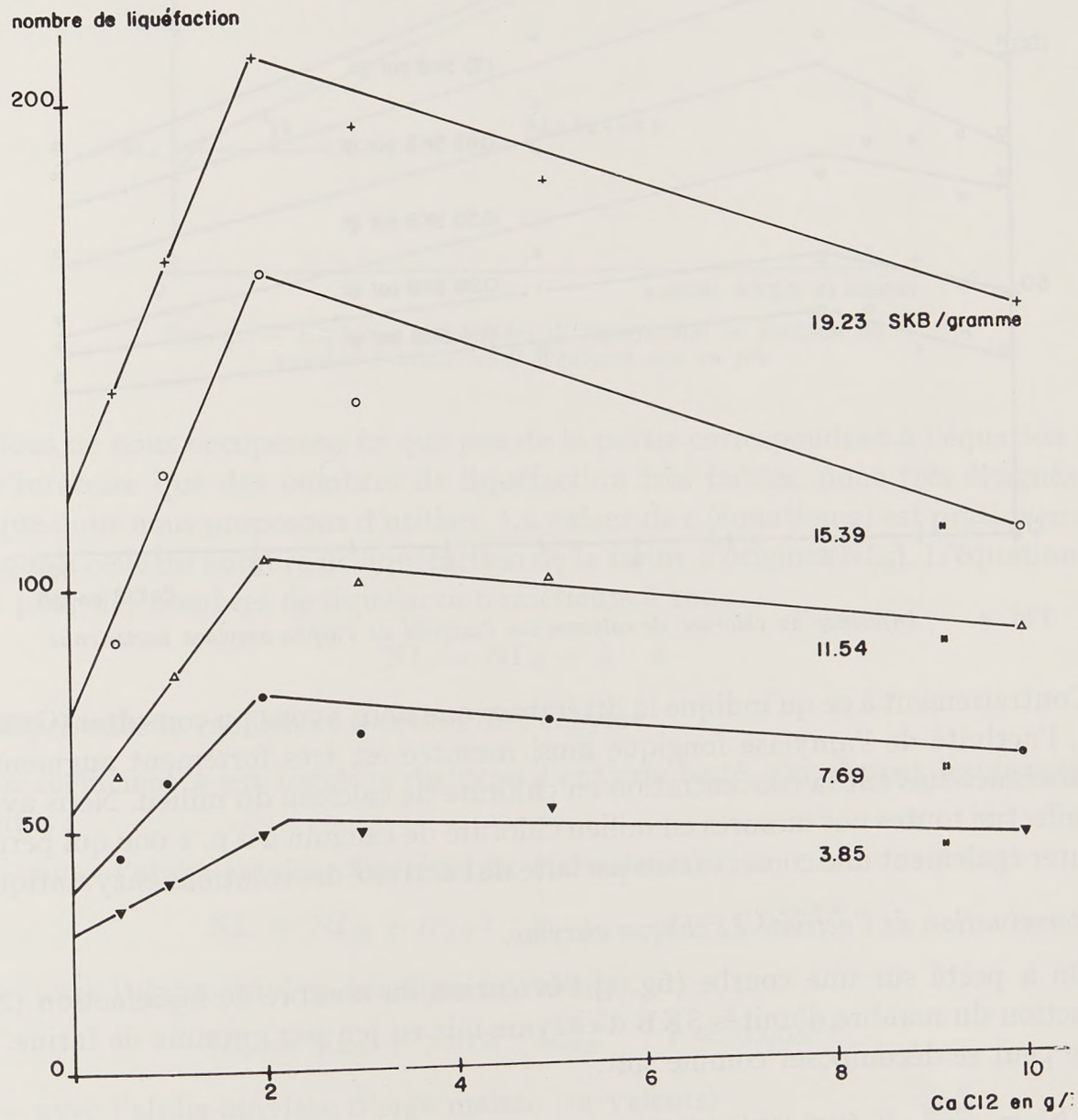


FIG. 2. — *Influence du chlorure de calcium sur l'activité de l'alpha-amylase fongique*

Résultats obtenus

1. *Influence de la concentration en chlorure de calcium sur l'activité des enzymes.*

Pour chaque type d'enzyme, plusieurs concentrations en alpha-amylase ont été testées en faisant varier les concentrations de chlorure de calcium de 0 à 1 p. 100. Les figures 1, 2 et 3 montrent l'évolution des nombres de liquéfaction (NL) [1] obtenus en faisant varier les concentrations en chlorure de calcium pour chaque dose d'enzyme envisagée. On remarque que la dose de 2 p. 1 000 habituellement utilisée se révèle être la quantité de chlorure de calcium permettant d'obtenir une activité maximale de l'enzyme.

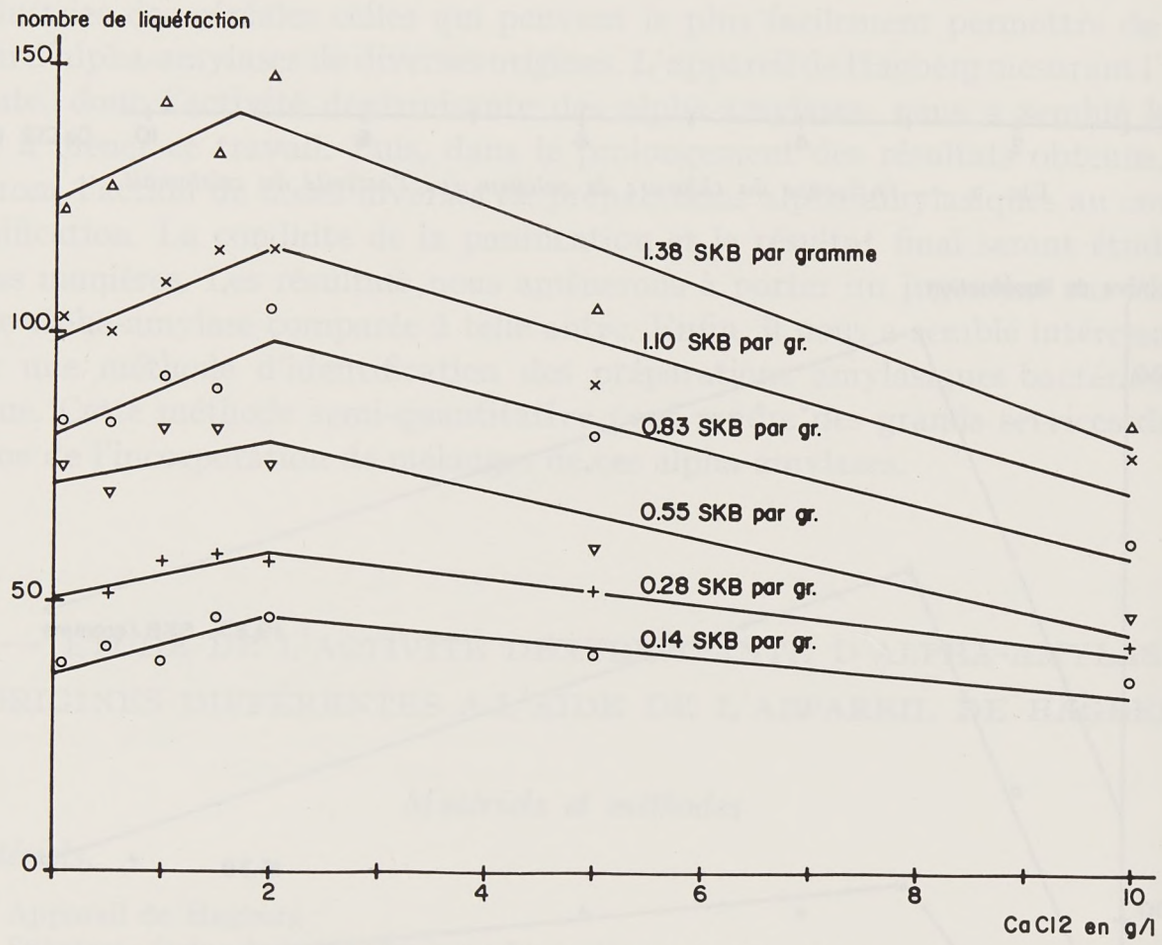


FIG. 3. — *Influence du chlorure de calcium sur l'activité de l'alpha-amylase bactérienne*

Contrairement à ce qu'indique la littérature que nous avons pu consulter (GREUP, 1954), l'activité de l'amylase fongique ainsi mesurée est très fortement augmentée, puis diminuée suivant la concentration en chlorure de calcium du milieu. Nous avons donc effectué toutes nos mesures en milieu chlorure de calcium à 2 p. 1 000 qui permet d'assurer également une conservation parfaite de l'activité des solutions enzymatiques.

2. *Détermination de l'activité de chaque enzyme.*

On a porté sur une courbe (fig. 4) l'évolution du nombre de liquéfaction (NL) en fonction du nombre d'unités SKB d'enzyme mis en jeu par gramme de farine. La courbe peut se décomposer comme suit.

[1] $NL = \frac{6000}{IC\text{-}50}$, IC étant l'indice de chute.

Soit « s » la quantité d'enzyme (exprimée en unités SKB ajoutées par gramme de farine) :

— pour les faibles doses d'enzymes,

$$NL = a \log s + b \qquad (1)$$

— pour les doses d'enzymes plus importantes,

$$NL = k \cdot s + c \qquad (2)$$

a, b, k et c étant des constantes.

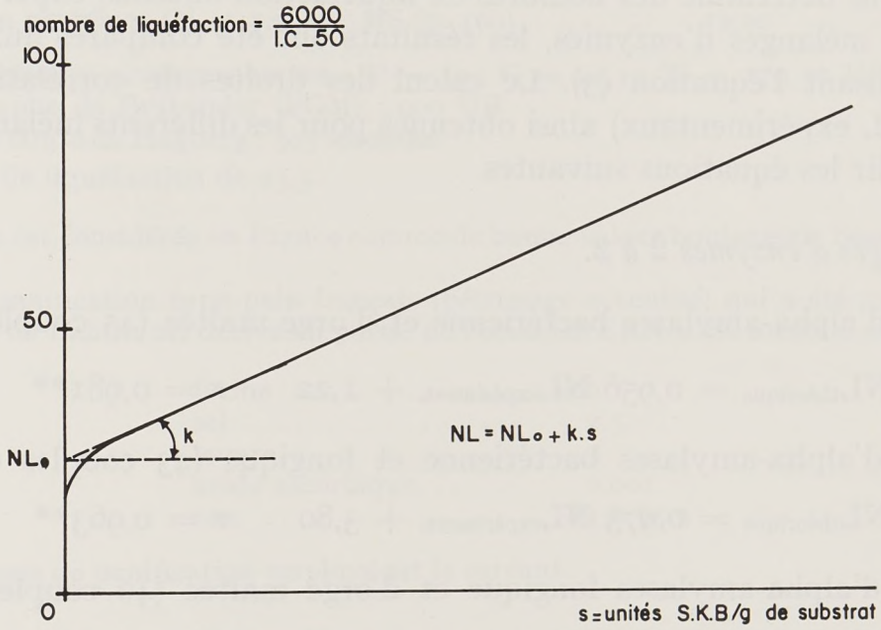


FIG. 4. — *Évolution du nombre de liquéfaction en fonction du nombre d'unités SKB d'enzyme mis en jeu*

Nous ne nous occuperons ici que peu de la partie correspondant à l'équation (1). Elle n'intéresse que des nombres de liquéfaction très faibles, donc très éloignés de ceux que nous nous proposons d'utiliser. La valeur de c (équation 2) est pratiquement identique à celle du nombre de liquéfaction de la farine d'origine (NL_0). L'équation (2) s'écrit pour des nombres de liquéfaction inférieurs à 100 :

$$NL = NL_0 + k \cdot s$$

où k représente le coefficient d'action de l'enzyme.

Ce coefficient k est fonction du type d'enzyme testé. On obtient les équations suivantes :

— avec l'alpha-amylase bactérienne (10 valeurs)

$$NL = NL_0 + 93{,}01 \cdot S_{bact.} \qquad r = 0{,}987^{**}$$

— avec l'alpha-amylase fongique (9 valeurs)

$$NL = NL_0 + 7{,}012 \cdot S_{fong.} \qquad r = 0{,}998^{**}$$

— avec l'alpha-amylase d'orge maltée (14 valeurs)

$$NL = NL_0 + 66{,}89 \cdot S_{malt} \qquad r = 0{,}997^{**}$$

3. *Établissement d'une règle des mélanges*

A partir du moment où le principe d'une relation linéaire entre le paramètre enregistré et la quantité d'alpha-amylases est admis, il est possible d'imaginer que l'action d'un mélange de 2 ou 3 amylases se traduira par l'équation

$$NL = NL_0 + \Sigma k_i \cdot s_i \qquad (3)$$

avec k_i : coefficient d'action propre à chaque enzyme ;
s_i : quantité de chaque enzyme mise en œuvre.

Nous avons déterminé des nombres de liquéfaction obtenus expérimentalement par action de mélanges d'enzymes, les résultats ont été comparés aux valeurs calculées en utilisant l'équation (3). Le calcul des droites de corrélation NL théoriques $= f$ (NL expérimentaux) ainsi obtenues pour les différents mélanges testés ont permis d'établir les équations suivantes.

a) *Mélanges d'enzymes 2 à 2.*

Mélange d'alpha-amylases bactérienne et d'orge maltée (45 couples de valeurs)

$$NL_{théorique} = 0{,}956\ NL_{expériment.} + 1{,}22 \qquad r = 0{,}981^{**}$$

Mélange d'alpha-amylases bactérienne et fongique (43 couples de valeurs)

$$NL_{théorique} = 0{,}973\ NL_{expériment.} + 3{,}80 \qquad r = 0{,}963^{**}$$

Mélange d'alpha-amylases fongique et d'orge maltée (40 couples de valeurs)

$$NL_{théorique} = 1{,}002\ NL_{expériment.} + 1{,}68 \qquad r = 0{,}992^{**}$$

b) *Mélange des 3 enzymes* (81 valeurs).

$$NL_{théorique} = 1{,}180\ NL_{expériment.} - 1{,}97 \qquad r = 0{,}990^{**}$$

La loi d'additivité se vérifie parfaitement avec les mélanges comprenant 2 enzymes. Par contre l'application de cette loi pour les mélanges comportant 3 enzymes donne des valeurs de NL supérieures aux valeurs expérimentalement obtenues.

Discussion

Un certain nombre de faits rapportés ici sont soit en contradiction avec la littérature, soit controversés par d'autres expérimentateurs. C'est ainsi que contrairement à la plupart des auteurs, nous avons constaté une action de l'ion calcium sur l'activité de l'enzyme fongique dont nous nous sommes servie.

Les résultats que nous avons obtenus, et d'autre part le travail de MILLER, JOHNSON et PALMER (1953) qui ont montré que pour obtenir le même état en cours de conservation d'un produit il fallait lui ajouter soit 2,6 unités SKB d'enzyme bactérienne, soit 312 unités SKB d'enzyme fongique, confirment la disproportion d'activité que nous avons montrée entre ces deux enzymes.

B. — ÉTUDE DE L'ACTION D'ALPHA-AMYLASES DE DIFFÉRENTES ORIGINES AU COURS DE LA PANIFICATION

Matériel et méthodes

On a panifié une farine industrielle obtenue à partir d'un mélange de blés français de boulangerie et de blés améliorants d'origine indigène et exotique. Les analyses effectuées sur cette farine ont donné les résultats suivants :

Teneur en matières minérales sur MS (p. 100) 0,59
Teneur en protéines (N × 5,7) sur MS (p. 100)..... 12,00

Caractéristiques alvéographiques : P = 50 ; G = 24,3 ; W = 179 et P/L = 0,41
Amylographe de Brabender (PGM) : 900 UB
Indice de chute de Hagberg : 305 secondes
soit un nombre de liquéfaction de 23,5

Cette farine est considérée en France comme de bonne valeur boulangère. Son pouvoir diastasique est faible.

L'essai de panification type pain français (pétrissage accentué) qui a été mis au point aux Grands Moulins de Pantin est dérivé en partie de l'essai CNERNA. Sa formule est :

farine	100
sel	2,5
levure.....	3
acide ascorbique.....	0,001
eau	61 à 63,5

Le diagramme de panification employé est le suivant :

Pétrissage { 5 mn à 40 tr/mn puis 15 mn à 80 tr/mn

	Pointage (1)	Apprêt (2)
Essai 1	20 mn	1 h 45
Essai 2	40 mn	2 h
Essai 3	60 mn	2 h 15

(1) Pointage : première fermentation en cuve.
(2) Apprêt : seconde fermentation sur couches.

Si la formule est similaire à celle du CNERNA, le diagramme de fermentation est essentiellement différent. Dans l'essai CNERNA, les différentes phases de la fermentation sont définies par rapport à un témoin, alors que dans cet essai les temps de fermentation ont été fixés une fois pour toutes. Par cet essai on cherche à mettre en évidence la tolérance des farines à la fermentation. A l'encontre de la boulangerie qui, le plus souvent, à un pointage court associe un apprêt long, et à un pointage plus long associe un apprêt plus court, on préfère associer à un pointage court un apprêt plus court, à un pointage plus long un apprêt plus long de manière à voir ce qui se passe aux limites de la fourchette de tolérance. Les pains qui sont cuits sont des pains courts pesés à 350 g de pâte. Il y a trois pains pour chaque temps de fermentation. On obtient des pains dont le poids moyen est de 278 grammes $\pm$ 2 p. 100.

Les résultats chiffrés qui sont retenus comme critères sont les suivants :

— Évolution de la fermentation de la pâte. La mesure se fait en introduisant à la fin du pétrissage 25 g de pâte dans le mesureur de pousse utilisé dans l'essai CNERNA. Les hauteurs de pâte sont lues à divers temps de fermentation. Il n'y a pas de reboulage du pâton au cours de cette mesure.

— Volume et poids de chaque pain pour chaque temps de fermentation, qui correspondent à la moyenne du volume et du poids des trois pains obtenus. On utilise le volume spécifique du pain (V/P) pour éliminer au maximum les variations dues à des différences dans la pesée et la cuisson. La reproductibilité des rapports V/P est bonne (erreur relative sur la moyenne inférieure ou égale à 5,5 p. 100 pour chaque temps de fermentation). La farine est considérée tolérante si le rapport V/P croît linéairement avec le temps de fermentation, et d'autant meilleure que le volume spécifique est élevé.

Outre ces résultats, on a dosé l'activité amylasique résiduelle dans la mie du pain après cuisson selon la méthode ICC Standard 108, réalisé des amylogrammes de mie dilacérée à matière sèche constante (76,5 p. 100 d'hydratation de la MS), déterminé les groupes réducteurs de la fraction osidique soluble dans l'eau présents dans la mie (exprimés en maltose pour 100 g de mie) et étudié la rétention d'eau de la mie dilacérée, 24 heures après cuisson.

A la farine au début du pétrissage ont été ajoutées des doses d'alpha-amylases permettant d'obtenir des farines à 250-200 et 150 secondes d'indice de chute de Hagberg en présence d'une dose constante de chlorure de calcium. Nous nous sommes basés sur l'indice de chute de Hagberg pour définir une gamme de nombres de liquéfaction de 23,5 (pour le témoin), 30, 40, 60.

Les préparations enzymatiques ajoutées étaient un extrait d'orge maltée des Éts Jacquemaire, dénomination commerciale « cristomalt », une préparation d'alpha-amylase fongique F25 n° 353, une préparation d'alpha-amylase bactérienne B25 n° 109. Ces deux préparations enzymatiques nous ont été fournies par la Société Rapidase.

Résultats

1. *Au niveau des pâtes.*

a) *Pétrissage*

L'appréciation du boulanger en fin de pétrissage est la suivante.

Lorsque l'indice de chute de Hagberg est inférieur à 200 secondes, la pâte est d'autant plus collante qu'on y ajoute davantage d'alpha-amylases. Elle se reprend d'autant moins bien que la dose est plus forte. Elle est d'autant plus facile à inciser à la mise au four que la dose est moins forte.

b) *La fermentation* (tabl. 1).

Le démarrage de la fermentation est plus rapide avec l'extrait d'orge maltée qu'avec les alpha-amylases bactérienne et fongique. Il est probable que cela est dû aux sucres apportés par ce produit. Par contre pour les temps de fermentation plus prolongés (2 h 40 mn, 3 h 15 mn) les différences sont très faibles entre les pâtes contenant différentes doses d'alpha-amylases d'origines différentes. Par rapport au témoin, en moyenne l'adjonction d'alpha-amylase multiplie la hauteur du pâton par 1,2 après 2 heures 40 mn de fermentation et par 1,5 après 3 heures 15 mn. La vitesse d'augmentation du volume de pâton diminue donc avec le temps. On note qu'au bout de 3 heures 15 mn de fermentation l'action de l'alpha-amylase bactérienne est sensiblement proportionnelle à la quantité ajoutée.

2. *Au niveau des pains.*

L'étude statistique des volumes spécifiques donne les résultats indiqués dans le tableau 2. Les volumes spécifiques des pains (V/P) ont été calculés pour chaque temps de fermentation (V/P_1, V/P_2, V/P_3). Pour chacun des rapports V/P_1, V/P_2 et

TABLEAU I

Indication du mesureur de pousse en fonction de l'adjonction de différentes préparations d'alpha-amylases en fonction du temps de fermentation total

Alpha-amylases	Indice de chute obtenu en secondes	Indications du mesureur de pousse (les résultats indiqués sont des moyennes)		
		1 h	2 h 40 mn	3 h 15 mn
bactérienne	305	1,80	3,35	3,78
	250	1,80	4,03	4,22
	200	1,80	4,13	4,31
	150	1,80	4,13	4,61
fongique	305	1,80	3,35	3,78
	250	1,80	3,74	4,22
	200	1,80	4,03	4,22
	150	1,80	3,93	4,22
cristomalt	305	1,80	3,35	3,78
	250	2,11	4,03	4,22
	200	2,21	4,13	4,22
	150	2,21	4,03	4,22

TABLEAU 2

Évolution du volume spécifique des pains en fonction du nombre de liquéfaction

Nombre de liquéfaction		V/P_1	V/P_2	V/P_3
23,5 (témoin)	moyenne	6,05	6,15	6,31
	σ	0,12	0,13	0,11
	$ER/\bar{x}$ (%)	4,74	5,25	4,00
30	moyenne	6,23	6,54	6,91
	σ	0,16	0,10	0,22
	$ER/\bar{x}$ (%)	6,05	3,71	7,51
40	moyenne	6,34	6,64	7,17
	σ	0,15	0,22	0,19
	$ER/\bar{x}$ (%)	5,69	7,99	6,25
60	moyenne	6,31	6,66	7,14
	σ	0,12	0,16	0,13
	ER/x (%)	4,62	5,67	4,45
Ensemble des essais avec alpha-amylases	moyenne	6,30	6,61	7,07
	σ	0,20	0,17	0,21
	$ER/\bar{x}$ (%)	6,20	5,09	5,80

$ER/\bar{x}$: erreur relative sur la moyenne.

V/P_3 la moyenne est significativement différente de la moyenne des rapports V/P correspondant au témoin panifié sans adjonction d'alpha-amylase. Par contre, ils ne sont pas significativement différents entre eux. La croûte des pains n'a pas été jugée trop colorée. Par ailleurs, on a pu montrer que la tolérance d'une farine à une action amylasique importante est fonction de la force boulangère de cette farine mesurée à l'alvéographe par exemple. Il convient donc de ne pas dissocier force boulangère et pouvoir diastasique des farines pour juger de leur tolérance lorsque les temps de fermentation varient au cours de la panification.

3. *Résultats des essais effectués sur la mie.*

Après cuisson, il ne reste qu'une infime quantité d'alpha-amylase de l'extrait d'orge maltée et fongique dans la mie (de l'ordre de $88 \cdot 10^{-4}$ unités SKB par gramme de mie sèche — témoin $84 \cdot 10^{-4}$). Par contre l'amylase bactérienne reste en quantités non négligeables proportionnellement aux quantités introduites dans la pâte. La mie présente une structure plus ou moins collante lorsqu'on augmente la quantité d'alpha-amylase. Ce phénomène est particulièrement sensible avec l'alpha-amylase bactérienne. Les amylogrammes faits avec de la mie dilacérée ont un PGM qui diminue d'autant plus que l'indice de chute de la farine panifiée est faible (fig. 5). Cette diminution est linéaire pour l'extrait d'orge maltée et l'alpha-amylase fongique. A même indice de chute de la farine panifiée, la mie semble moins dégradée avec l'extrait d'orge maltée qu'avec l'alpha-amylase fongique.

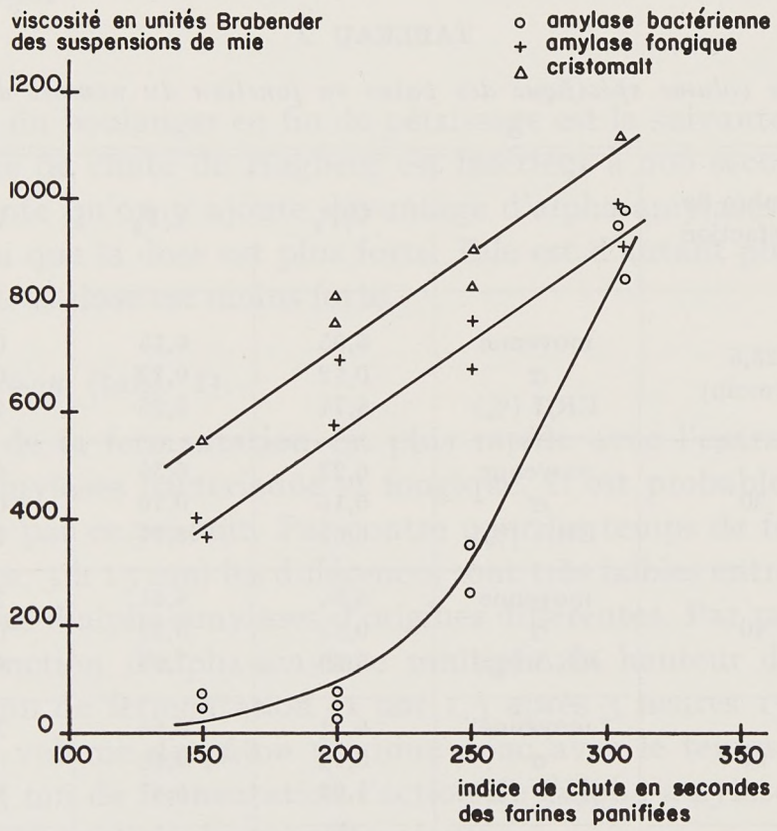


Fig. 5. — *Relation entre les indices de chute des farines panifiées et la viscosité de la mie dilacérée*

Pour l'amylase bactérienne la diminution est brutale. Il ne semble pas qu'un autre phénomène se produise au cours de l'amylase puisque l'adjonction de chlorure mercurique (inhibiteur de l'enzyme) ne change pas les résultats.

Cette évaluation de la dégradation de l'amidon est confirmée par la détermination des sucres existants dans la mie. Les sucres réducteurs présents dans la mie ont été exprimés conventionnellement en maltose pour 100 g de mie. Au fur et à mesure que la viscosité de la suspension de mie diminue à l'amylographe, le taux de sucres réducteurs dosé dans la mie augmente (fig. 6).

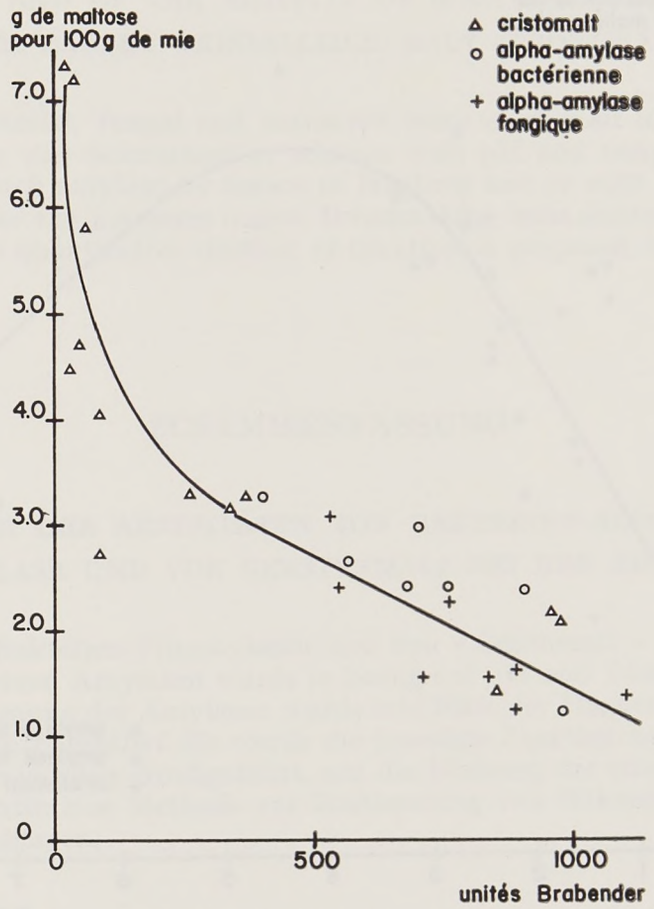


FIG. 6. — *Relation entre la viscosité de la mie dilacérée et les sucres dans la mie*

Pour l'alpha-amylase fongique et de l'extrait d'orge maltée, le pourcentage de rétention d'eau par la mie croît avec leur adjonction. Pour l'alpha-amylase bactérienne cela est vrai sauf pour les plus fortes doses ; en effet le pourcentage d'eau retenu qui traduit ce phénomène diminue brutalement aux fortes quantités ajoutées (fig. 7). A partir de ce moment, il y a une dégradation irréversible qui ne décrit plus le phénomène général.

Ces résultats peuvent être mis en parallèle avec une certaine tendance au rassissement puisque différents auteurs indiquent qu'avec le temps le pouvoir d'absorption de la mie diminue. L'adjonction d'alpha-amylase tendrait à retarder le rassissement. L'action intensive de l'alpha-amylase bactérienne entraîne une perte de capacité d'absorption d'eau par la mie. Ces expériences n'ont pas été poursuivies dans le temps au-delà de 24 heures. Le problème de la conservation de pains, type pains français, n'est pas d'un intérêt essentiel au-delà de ce délai.

De l'ensemble des résultats obtenus, il est possible de tirer les conclusions suivantes.

L'adjonction d'alpha-amylase peut avoir dans certaines conditions une action bénéfique sur le volume du pain, sa couleur, sa tendance à moins rassir. Ces résultats ne sont pas nouveaux.

La quantité d'alpha-amylase à ajouter ne peut être déterminée que par une panification si l'on considère que ni les unités SKB (ou les unités A) ni l'indice de chute de Hagberg ne permettent de prévoir le résultat final (dans le cas où l'on s'adresse à des préparations enzymatiques d'origines différentes).

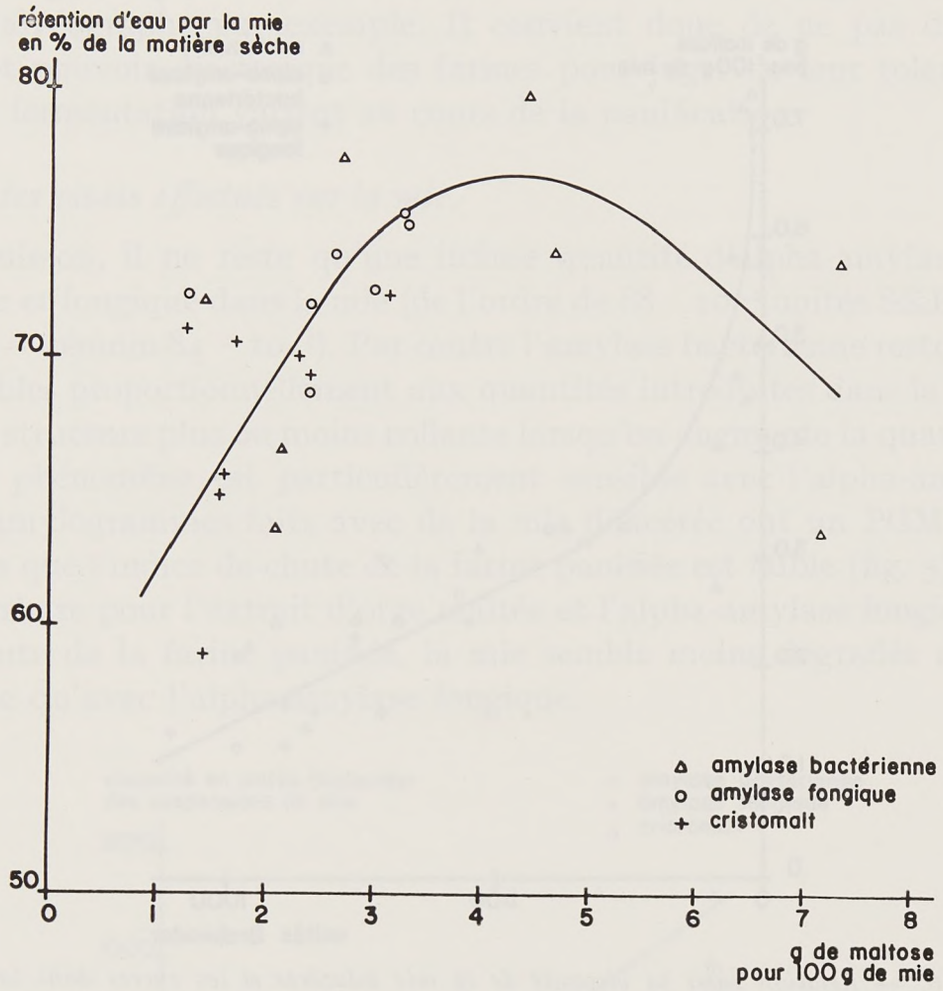


FIG. 7. — *Relation entre les indices de maltose de la mie et sa capacité de rétention*

L'action liquéfiante importante de l'amylase bactérienne et sa grande thermostabilité rendent son emploi délicat.

L'action plus rapide de l'extrait d'orge maltée est un avantage.

L'alpha-amylase fongique semble favoriser un bon développement au four.

Mis à part l'extrait d'orge maltée, il n'a pas été possible de mettre en évidence une amélioration du goût du pain par adjonction d'amylase.

Les essais menés avec des mélanges de préparations enzymatiques n'ont pas apporté de résultats particuliers.

REMERCIEMENTS

Nous remercions les établissements Jacquemaire qui nous ont fourni gracieusement l'extrait de malt et la société Rapidase pour la fourniture des alpha-amylases.

SUMMARY

COMPARISON IN BREADMAKING OF BACTERIAL α-AMYLASE, FUNGAL α-AMYLASE ACTIVITY AND OF THE ACTIVITY OF α-AMYLASE EXTRACTED FROM BARLEY CRISTALLIZED MALT (CRISTOMALT)

The activity of bacterial, fungal and extracted from cristomalt α-amylases was studied. The formation of sugars was determined in relation with pH and temperature. A viscometric study was realised for each amylase by means of Hagberg test or with Brabender amylograph. A law was developped for the amylases mixes. Breadmaking tests showed the advantage of each amylase. Finally, a semi quantitative method of titration is proposed for bacterial and fungal amylases in mixes.

ZUSAMMENFASSUNG

VERGLEICH DER AKTIVITÄTEN VON BAKTERIEN-ALPHAAMYLASE, PILZ-ALPHAAMYLASE UND VON GERSTENMALZ BEI DER BROTHERSTELLUNG

Die Wirkung von Bakterien-Pilzamylasen und von « Cristomalt » wurden untersucht. Die Zuckerbildung der einzelnen Amylasen wurde in bezug auf pH und Temperatur bestimmt. Eine viskosimetrische Bestimmung der Amylasen wurde mit Hilfe der Hagberg-methode und des Brabender-Amylographen durchgeführt. Es wurde die jeweilige Zusatzmenge für die drei Amylasen bestimmt. Backversuche wurden durchgeführt, um die Wirkung der einzelnen Amylasen hervorzuheben. Eine halbquantitative Methode zur Bestimmung von Bakterien-und Pilzamylasen in Gemischen wird vorgeschlagen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BOURDET A., 1961. Phénomènes amylolytiques en technologie boulangère. I. Nature et mode d'action des amylases. Moyens d'apprécier leur activité. *Meunerie franç.*, 168.

BOURDET A., 1961. Phénomènes amylolytiques en technologie boulangère. II. Appréciation pratique de l'activité alpha-amylasique des farines de blé. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 301-318.

CENTRE TECHNIQUE DE L'UNION. Influence d'une alpha-amylase en technologie de panification fine. *Bull. Inform. techn.*, 8.

DRAPRON R., 1961. État actuel de nos connaissances sur l'action des amylases en panification, biscotterie et biscuiterie. *Bull. École franç. Meunerie*, (182), 69-80.

DRAPRON R., GUILBOT A., 1962. Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés. La dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 175-218, 275-317.

GRAY, 1953. Fungal enzymes in the bakery fact and fancy. *Wallerstein Laborat. Communic.*, 215-228.

GREENWOOD-MILNE, 1968. Studies on starch degrading enzymes. Part VIII. A comparison of alpha-amylases from different sources : their properties and action patterns. *Die Stärke* (5), 139-150.

GREUP, 1954. Fungal enzymes and their use in bread making. *Wallerstein Laborat. Communic.*, 105-116.

HOPKINS, Dora KULKA, 1942. Kinetics of starch saccharification by the two enzymes. *Wallerstein Laborat. Communic.*, 115-124.

JOHNSON, MILLER, 1949. Studies on the role of alpha-amylase and proteinase in bread making. *Cereal Chem.*, **26**, 371-383.

JOHNSON, MILLER, 1953. Enzymes systems important in bread making. *Wallerstein Laborat. Communic.*, 105-117.

MERCIER C., COLAS A., 1967. Les amylases en panification. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21**, 299-340.

Miller, Johnson, Palmer, 1953. A comparison of cereal, fungal and bacterial alpha-amylases as supplements for bread making. *Food Technol.*, 38-42.

Perten, 1965. Détermination de l'activité alpha-amylasique et de la qualité de l'amidon par la méthode du temps de chute. *Meunerie franç.*, 25-32.

Sandstedt, Gates, 1953. Raw starch digestion : a comparison of the raw starch digesting capabilities of the amylase systems from four alpha-amylase sources. *Cereal Chem.*, 190-199.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 175-189.

UTILISATION D'ALPHA-AMYLASE ET DE GLUCAMYLASE EN TECHNOLOGIE DE PANIFICATION INDUSTRIELLE

G. BUSSIÈRE et J.-F. de la GUÉRIVIÈRE
avec la collaboration technique de R. GÉRARD

Centre technique des Unions (C. T. U.),
194, rue de Rivoli,
75001 Paris

RÉSUMÉ

Les alpha-amylases d'origine bactérienne, outre leur action dextrinisante, présentent un intérêt en panification fraîche par leur pouvoir antirassissant dû au fait qu'elles ne sont pas entièrement inhibées au cours des processus de cuisson et qu'elles s'opposent à la rétrogradation de l'amidon, cause primordiale du rassissement. La glucamylase (ou amyloglucosidase), qui dégrade l'amidon directement en glucose, présente un effet bénéfique sur la fermentation panaire puisque ce sucre est directement assimilable par la levure boulangère. Les études menées ont montré que les préparations enzymatiques de glucamylase pourraient être utilisées par l'industriel (sous réserve d'une minoration de leur coût actuel) :

— en tant qu'adjuvant : utilisée à très faible dose, cette enzyme améliore toutes les phases de la fabrication ;
— en tant que composant de la formule, c'est-à-dire en remplacement total ou partiel du saccharose de la formule.

Une étude comparative de l'adjonction de saccharose et de glucamylase a été conduite et a abouti à l'établissement d'une équivalence entre ces deux sources glucidiques. Enfin, il est traité du rôle de l'adjonction simultanée d'alpha-amylase et de glucamylase.

Les phénomènes enzymatiques sont présents et connus de longue date en technologie de panification. Les praticiens connaissent la signification de « année diastasique » ou « année peu diastasique » et ils savent adapter leur technologie à la présence plus ou moins marquée d'enzymes. Cependant l'apport d'enzymes exogènes n'a été envisagé que très récemment.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 69-01-575-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

Préalablement, il est indispensable de définir ce que nous entendons par panification fine : dans cette branche sont regroupés tous les produits de panification fabriqués industriellement et ce, à l'exclusion du pain français. C'est à dessein que nous insistons sur le terme « industriellement » qui évoque la notion de continuité dans la fabrication, cette continuité étant stigmatisée dans la pratique par l'existence de la « ligne de fabrication » avec ses principales phases, qui sont : le pétrissage, le divisage et le boulage, le laminage, la fermentation, la cuisson. La bonne aptitude d'une pâte à subir cette série d'opérations mécanisées est donc essentielle pour l'homme d'usine et, pour l'exprimer, il utilise couramment le terme de « machinabilité ».

Les alpha-amylases hydrolysant « au hasard » les liaisons alpha D (1-4) de l'amidon forment des polysaccharides de poids moléculaire nettement inférieur à celui de l'amidon. C'est pourquoi ces enzymes sont qualifiées de dextrinisantes ou encore de liquéfiantes.

Il est bien connu des techniciens de la panification fine que les alpha-amylases présentes en excès et ce, quelle que soit leur origine, ont en général un rôle néfaste en fabrication, par le fait qu'elles rendent les pâtes collantes (phénomène lié à la présence de dextrines), ce qui correspond comme nous venons de le définir à une diminution de « machinabilité » avec tous les risques d'incidents de fabrication que cela comporte à l'échelon industriel. Malgré cet inconvénient non négligeable, nous avons envisagé la mise en œuvre d'alpha-amylases, mais uniquement d'alpha-amylases d'origine bactérienne, car celles-ci sont les seules à pouvoir présenter un avantage susceptible de compenser largement l'inconvénient que nous venons d'indiquer : en effet, les alpha-amylases bactériennes présentent un pouvoir antirassissant notable comme l'avaient déjà montré de nombreux travaux anglo-saxons.

TABLEAU I

Principales caractéristiques des amylases

	pH optimal	Température optimale (°C)	Température d'inactivation à 50 p. 100 (°C)	Température d'inactivation (°C)
Bêta-blé	4-5	55	65	75
Alpha-blé	4-5	65-70	73	90
Alpha-malt d'orge	4,7-5,4	55	70	80
Alpha-fongique	5-7	65	70	80
Alpha-bactérienne	5-7	70	85	105
Glucamylase (*Asp. niger*)	4,5	60		

Une explication peut être tirée de l'examen de la dernière colonne du tableau I où est portée la température d'inactivation de différentes amylases. Il apparaît que seule l'alpha-amylase d'origine bactérienne garde une activité non nulle à la température de 100°C. Or, 100°C est la température maximale atteinte par la mie du pain

au cours de sa cuisson. En conséquence, cette activité résiduelle pourrait se poursuivre dans les pains au cours de leur conservation ; elle freinerait ainsi la rétrogradation de l'amidon, cause essentielle du rassissement.

Seules les alpha-amylases d'origine bactérienne ont donc été testées et ce, uniquement dans le cadre de formulations de produits frais. Pour cette raison, nous avons retenu une formule de type pain de mie. Toutes les fabrications ont été réalisées selon l'essai de cuisson standardisé mis au point par le C. T. U. Tout au long de l'étude, un seul lot de préparation commerciale d'alpha-amylase provenant du *Bacillus subtilis* dont l'activité était de 2 500 SKB/g a été utilisé.

L'influence de l'alpha-amylase bactérienne au stade du pétrissage est suivie à l'aide du farinographe Brabender, pétrin enregistreur de la consistance au cours du temps. A différentes températures (comprises entre 25 et 34°C) est réalisée une série de farinogrammes, les uns sur pâte témoin, les autres sur pâte comportant 2,5 SKB d'alpha-amylase/100 g de farine mise en œuvre. La figure 1 présente trois graphiques où sont portées les valeurs de consistance de la pâte en fonction de la température pour trois temps de pétrissage : 10, 20 et 30 mn. Il ressort qu'avec l'alpha-amylase la consistance est inférieure, quelle que soit la température.

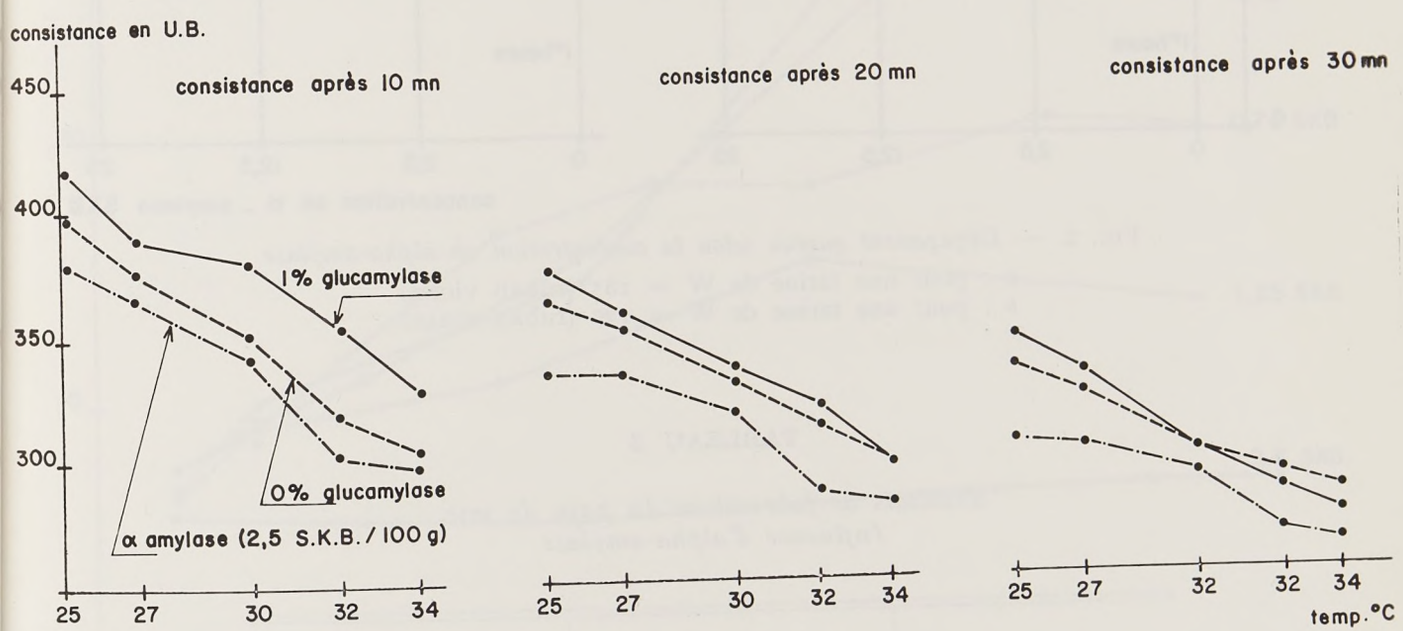


Fig. 1. — *Farinogrammes*

Au niveau de la fermentation, l'alpha-amylase présente aussi une action manifeste sur l'activité fermentative de la levure. Les volumes gazeux horaires enregistrés à l'aide du zymotachygraphe Chopin sont portés sur la figure 2 en fonction de la dose d'alpha-amylase. Les résultats obtenus à partir de deux farines différentes sont similaires et montrent que la fermentation n'est accentuée qu'après des temps relativement longs ; cette action croît avec la teneur en enzyme.

Les résultats précédents sont complétés par d'autres qui concernent tant le caractère collant des pâtes que l'appréciation organoleptique des pains. Ces résultats sont regroupés dans le tableau 2. Indiquons au préalable que la farine mise en œuvre a été choisie à dessein très peu diastasique, d'où l'émiettement important de la mie dans le cas de l'essai témoin.

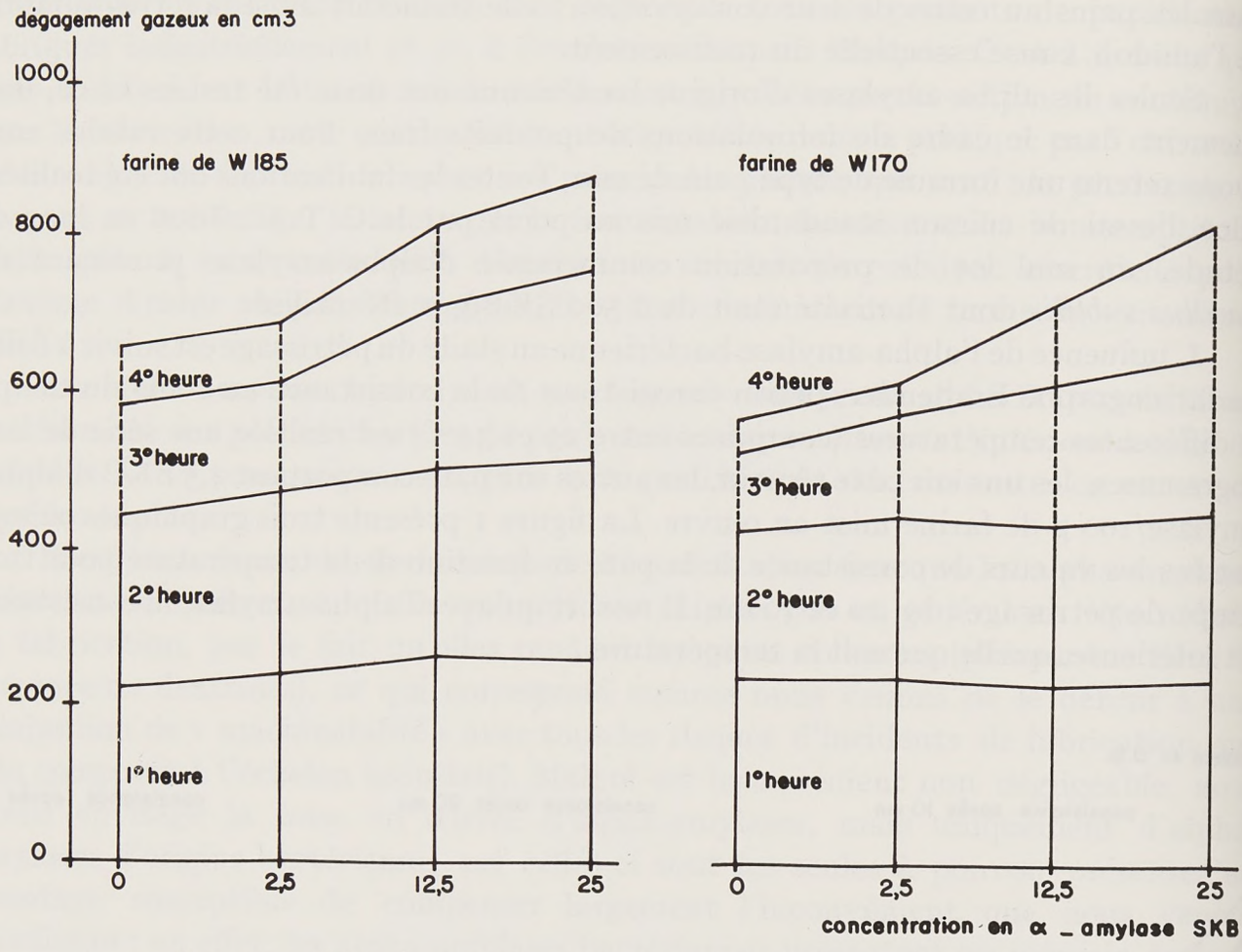


FIG. 2. — *Dégagement gazeux selon la concentration en alpha-amylase*
a : pour une farine de W = 185 (ruban violet)
b : pour une farine de W = 170 (ruban rouge)

TABLEAU 2

Résultats de fabrication du pain de mie.
Influence d'alpha-amylase

SKB	Adhérence des pâtes	Appréciation de la mie
0	nulle	sèche émiettement
0,25	nulle	normale
0,75	nulle	normale
1,25	faible	normale
2,5	nette	légèrement collante
12,5	excessive	collante

Les concentrations en alpha-amylase varient de 0 à 25 SKB (rapportés à 100 g de farine mise en œuvre). Le caractère collant des pâtes apparaît dès la dose de 1,25. On peut admettre que, dès la concentration de 2,5, la pâte ne pourrait plus être laminée au stade industriel.

Quant aux appréciations sur la mie des pains, portées 24 h après leur fabrication, elles indiquent que lors de la mise en œuvre de farines très peu amylasiques (cas présent) de faibles concentrations d'alpha-amylase ont un effet bénéfique. Mais le caractère collant de la mie réapparaît à la dégustation dès que le taux atteint 2,5 SKB.

En complément, une étude du raffermissement de la mie au cours du temps a été menée par mesures pénétrométriques. Sur la figure 3 est portée, en fonction du temps, la force de réaction en g opposée par la mie à la pénétration d'une sonde cylindrique.

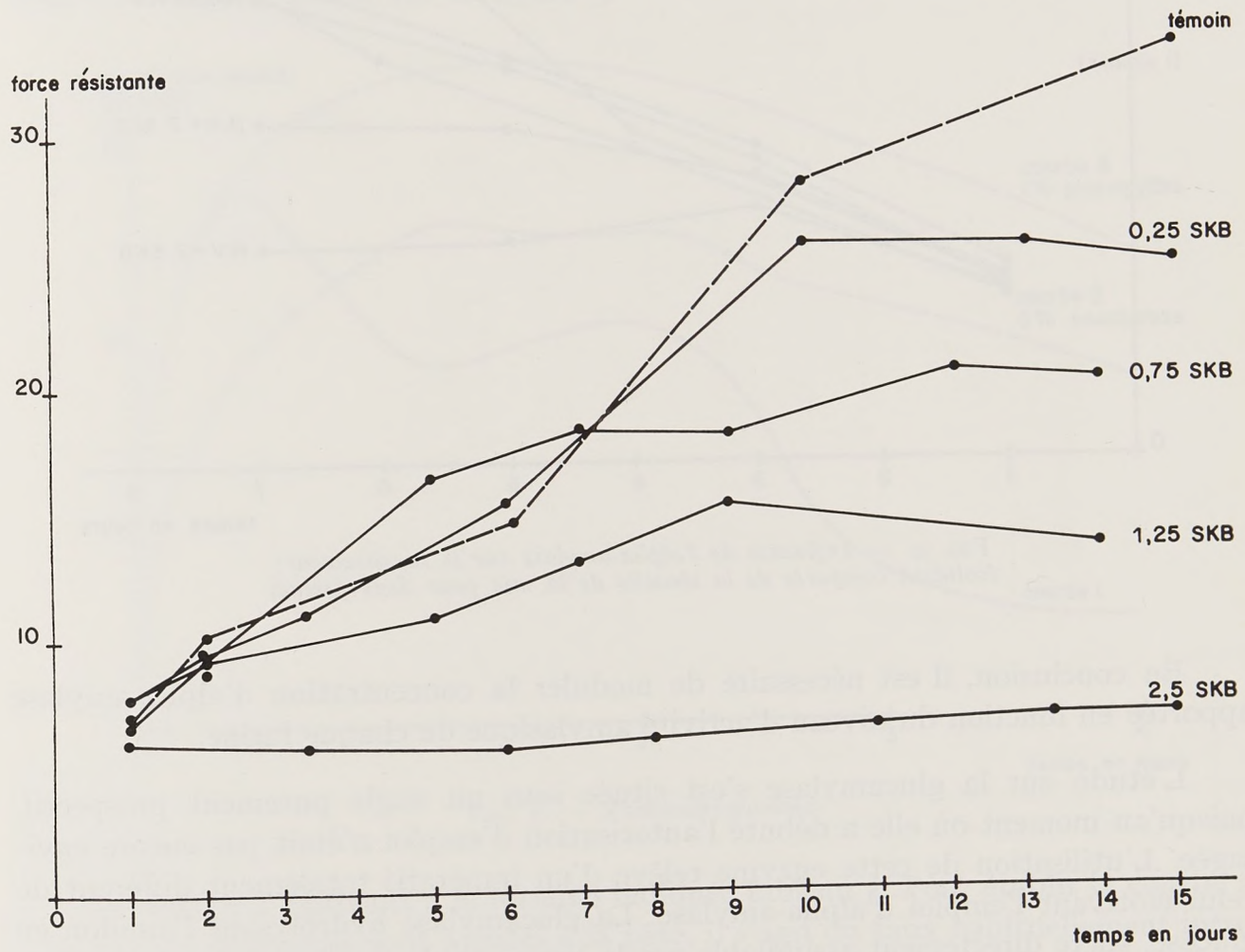


FIG. 3. — *Influence de l'alpha-amylase sur le rassissement: évolution de la ténacité de la mie*

L'action bénéfique de cette enzyme est très sensible surtout à partir du septième jour de conservation. Il est à remarquer que la concentration de 2,5 SKB inhibe totalement le raffermissement de la mie ; cependant, celle-ci est jugée collante à la dégustation durant les 15 jours de conservation.

En conclusion, on peut admettre qu'un taux voisin de 1 SKB/100 g de farine constitue un optimum dans les conditions de ces essais, tant au niveau de la fabrication qu'à celui de la conservation du produit fini.

Ces résultats sur le raffermissement des pains au cours du temps se devaient d'être confirmés : deux farines d'activités alpha-amylasiques assez différentes ont

été mises en œuvre comme précédemment. La farine référencée RR correspond à la précédente, donc très peu diastasique ; celle référencée RV se situe à un niveau moyen, puisque le temps de chute Hagberg est de 245 s. Dans les deux cas, les mêmes doses d'alpha-amylase ont été apportées, soit 0-0,25 et 2 SKB/100 g. Les résultats portés sur la figure 4 confirment les précédents ; il est à noter que le classement des courbes s'effectue selon le niveau alpha-amylasique d'origine de chaque farine.

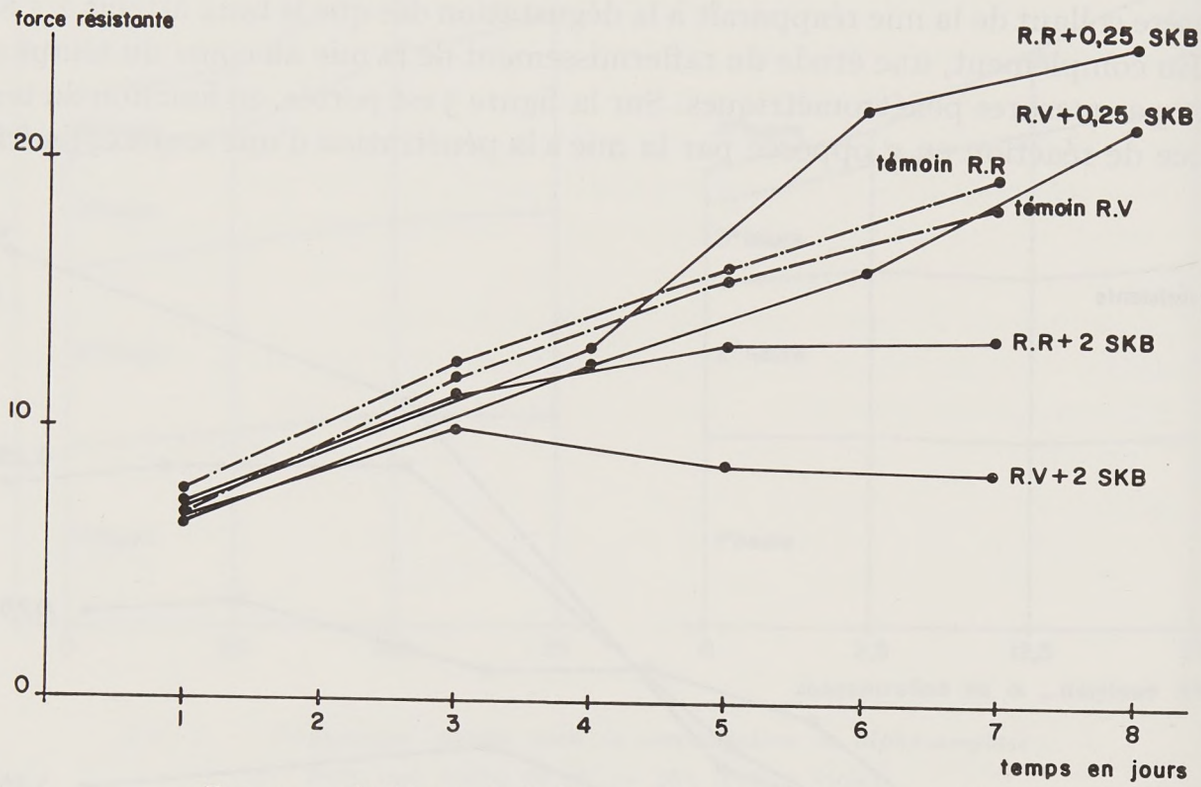


FIG. 4. — *Influence de l'alpha-amylase sur le rassissement : évolution comparée de la ténacité de la mie pour deux farines*

En conclusion, il est nécessaire de moduler la concentration d'alpha-amylase apportée en fonction du niveau d'activité amylasique de chaque farine.

L'étude sur la glucamylase s'est située sous un angle purement prospectif, puisqu'au moment où elle a débuté l'autorisation d'emploi n'était pas encore envisagée. L'utilisation de cette enzyme relève d'un impératif totalement différent de celui motivant l'emploi d'alpha-amylase. La glucamylase hydrolysant l'amidon en glucose, sucre directement assimilable par la levure boulangère, se doit d'agir favorablement sur la fermentation panaire. Cette enzyme est extraite de différents organismes tels qu'*Aspergillus niger* et *Rhizopus delemar*. Elle est connue sous les divers noms de gluco-amylase, amylo-glucosidase ou encore gamma-amylase. Elle hydrolyse à partir d'une extrémité des chaînes les liaisons alpha D (1-4) et alpha D (1-6) de l'amidon et est donc capable de dégrader entièrement ses deux constituants que sont l'amylose et l'amylopectine.

La détermination du niveau d'activité glucamylasique est importante pour l'utilisateur industriel ; deux raisons peuvent être invoquées : d'une part, il doit pouvoir vérifier la conformité aux spécifications concernant les préparations commerciales qu'il sera amené à acquérir, d'autre part, il doit être capable de déterminer avec précision la concentration d'incorporation pour une fabrication donnée.

Il existe une méthode chimique internationale de détermination de l'activité glucamylasique. L'unité internationale est par définition la quantité d'enzyme qui libère, dans des conditions parfaitement définies, une micromole de glucose par minute. Si la rigueur et la précision d'une telle méthode donnent satisfaction à l'analyste, elle se révèle pratiquement inapplicable dans un laboratoire d'usine. Pour cette raison, nous avons cherché à mettre au point une méthode pratique. Elle repose sur la relation entre la quantité de sucres consommés par la levure et le volume de gaz carbonique produit par celle-ci. Pour ce faire, le zymotachygraphe Chopin a été utilisé. Il s'agit d'un appareil enregistreur de la vitesse de fermentation. Les zymotachygrammes sont donc les diagrammes de vitesse du dégagement gazeux et la surface comprise sous la courbe représente le volume gazeux total dégagé. De tels diagrammes sont portés sur la figure 5.

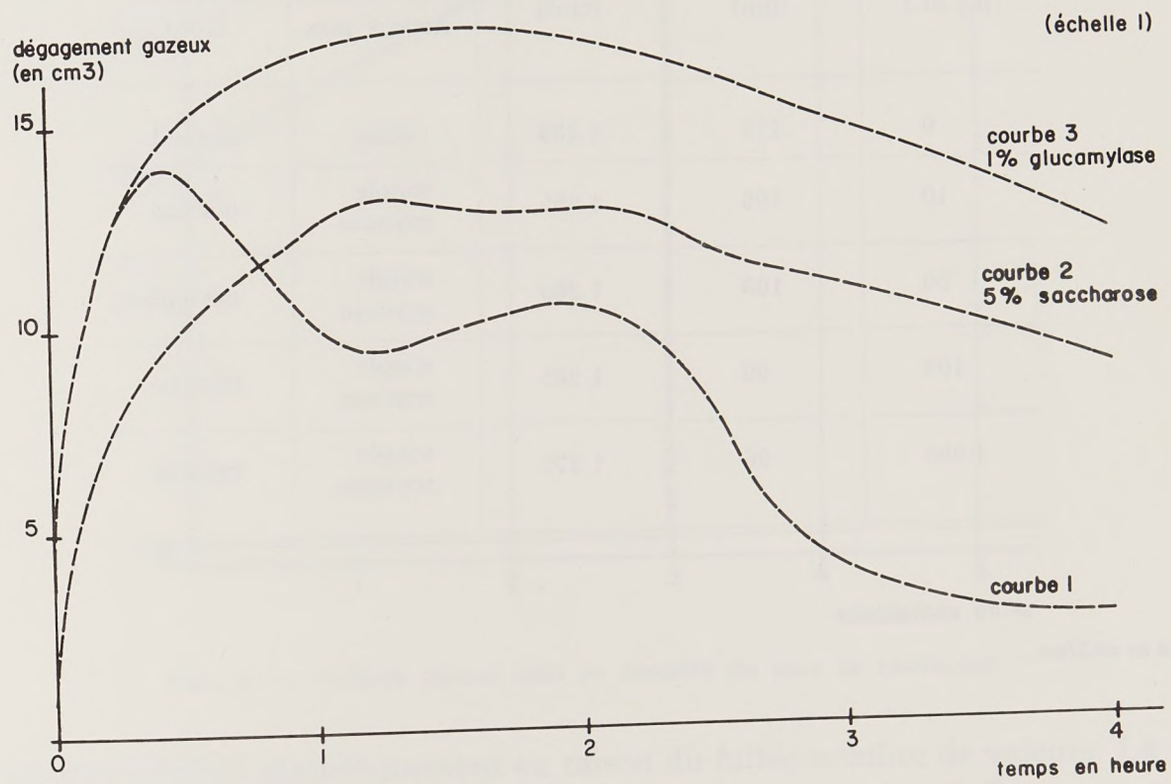


FIG. 5. — *Zymotachygrammes*

La courbe 1 équivaut à la formule indiquée tableau 3. Pour établir la courbe 2, 5 p. 100 de saccharose sont ajoutés à la pâte, il s'agit du taux habituellement introduit en formulation biscottière. Pour la courbe 3, une concentration très élevée de glucamylase a été ajoutée. Le protocole expérimental retenu peut se résumer comme suit : 300 g de pâte pétrie à 27°C sont introduits dans la cuve de l'appareil thermostaté à la même température, l'enregistrement étant assuré durant 6 heures.

La formule de base retenue est la suivante :

Farine	100
Levure	5
Eau	57
Total	162

Il s'agit d'une formule de type pain biscotte simplifiée, puisqu'elle ne comporte ni matière grasse, ni sucre.

La méthode a tout d'abord été testée par la réalisation d'une série d'essais comportant des taux de saccharose croissants, soit 0-2-3-4 et 5 p. 100 (pourcentages exprimés par rapport au poids de farine). Les zymotachygrammes correspondants sont portés sur la figure 6. Sur la figure 7 sont portés les volumes totaux dégagés durant les 6 h de fermentation, en fonction du taux de saccharose. La relation est linéaire. La différence entre le volume total correspondant à un certain taux de saccharose (5 p. 100 par exemple) et le volume relatif à l'essai témoin fournit le volume réellement dû

TABLEAU 3

Glucamylase (p.p.m.)	Fermentation (mn)	Volume (cm^3)	Dégustation	
			Aspect mie	Goût
0	115	1 235	sèche	normal
10	106	1 255	souple soyeuse	normal
50	103	1 260	souple soyeuse	normal
100	99	1 265	souple soyeuse	brioché
1 000	96	1 275	souple soyeuse	brioché

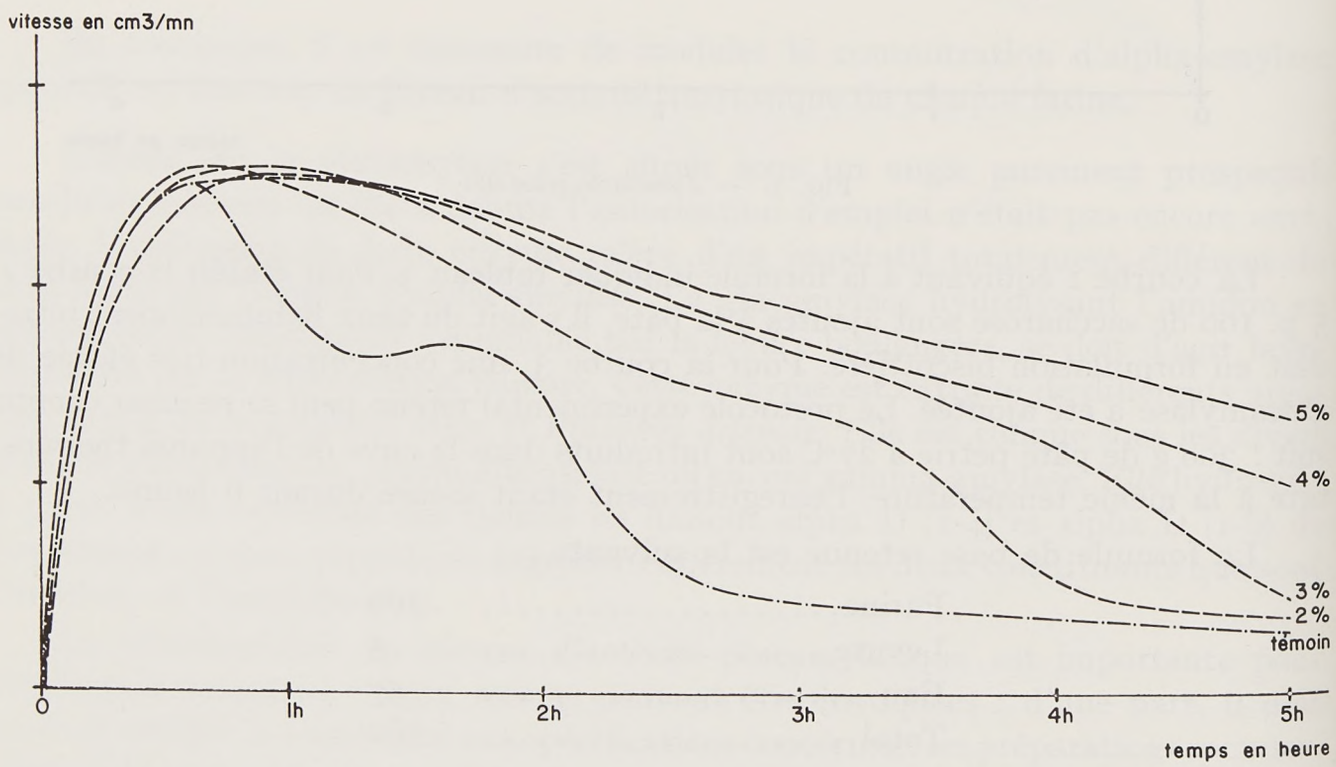


FIG. 6. — *Zymotachygrammes : vitesse de dégagement gazeux en fonction du temps*
(pâtes avec saccharose)

à l'adjonction des 5 p. 100 de saccharose. Ce mode d'expression met en évidence qu'il y a proportionnalité entre quantité de sucre consommé et volume de gaz carbonique dégagé. La répétabilité de la méthode peut être estimée correcte, bien qu'elle

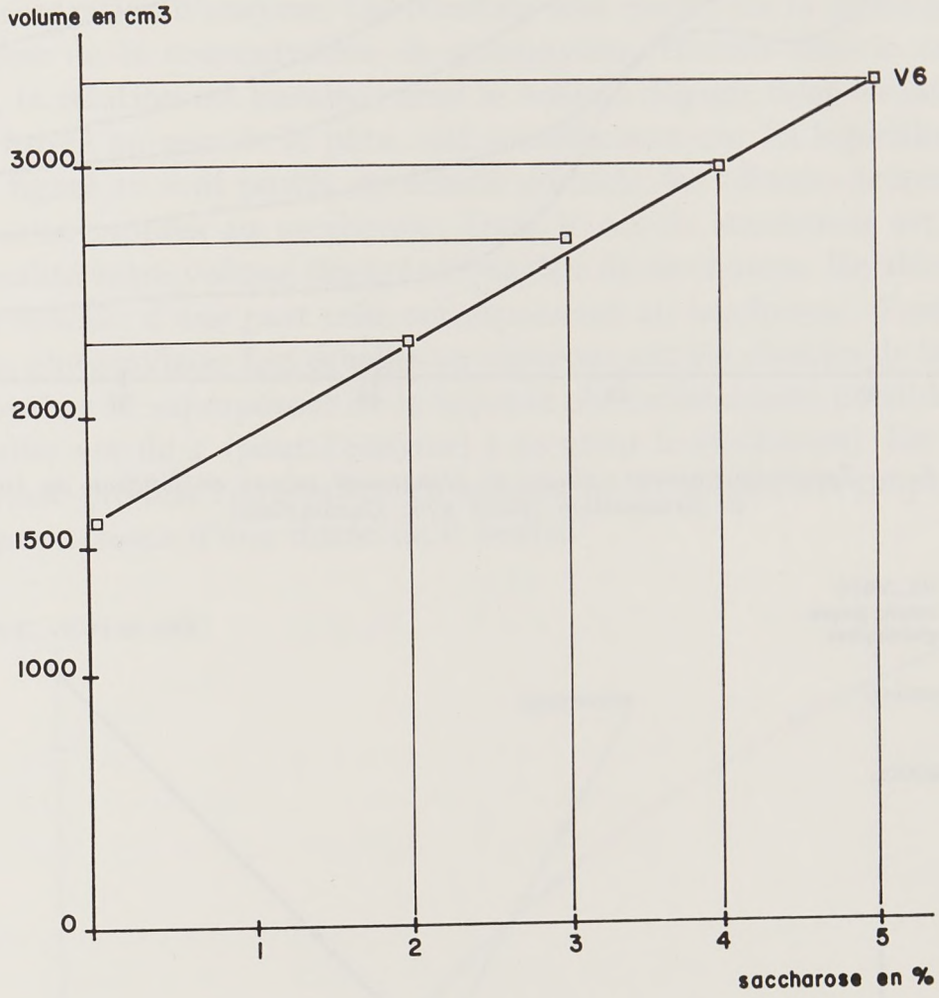


FIG. 7. — *Volume gazeux total en fonction du taux de saccharose*

n'ait pû être chiffrée statistiquement en raison du faible nombre de valeurs. La relation entre volume dégagé et sucre introduit est telle que 1 g de saccharose provoque un dégagement de 200 ml, ce qui correspond à un rendement de 76 p. 100 par rapport à la réaction théorique de transformation de ce sucre en alcool et gaz carbonique.

L'étude sur la glucamylase a été menée avec une préparation commerciale fournie par la firme contractante Rapidase. Des concentrations croissantes de cette enzyme allant de 0,1 à 1 p. 100 (par rapport au poids de farine) ont été ajoutées dans la formule de base. Les différents zymotachygrammes sont portés sur la figure 8. Son examen révèle l'efficacité de cette enzyme au plan de la fermentation. Il est à remarquer que, même lors de l'apport de doses importantes de glucamylase (1 p. 100 par exemple), la fermentation est légèrement accélérée dès la première heure. Or, il est visible sur la figure 6 (zymotachygrammes avec saccharose) qu'avec des taux de saccharose importants la fermentation est ralentie au départ, vraisemblablement en raison du choc osmotique subi par les cellules de levure. D'ailleurs, il est bien connu des praticiens qu'avec des taux de sucre dépassant 7 p. 100 la fermentation est sensiblement ralentie. Il ressort que la glucamylase, réalisant un apport de glucose pro-

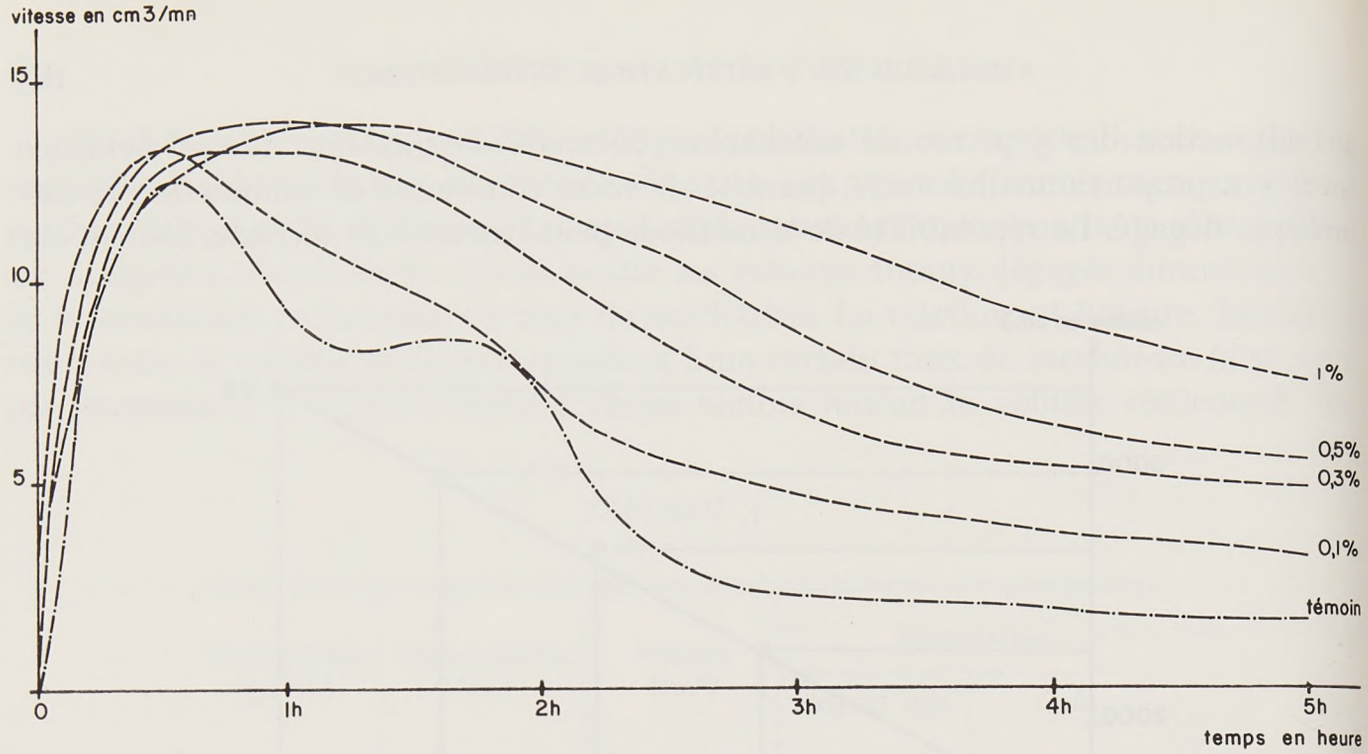


FIG. 8. — *Zymotachygrammes : vitesse de dégagement gazeux en fonction du temps de fermentation* (pâtes avec glucamylase)

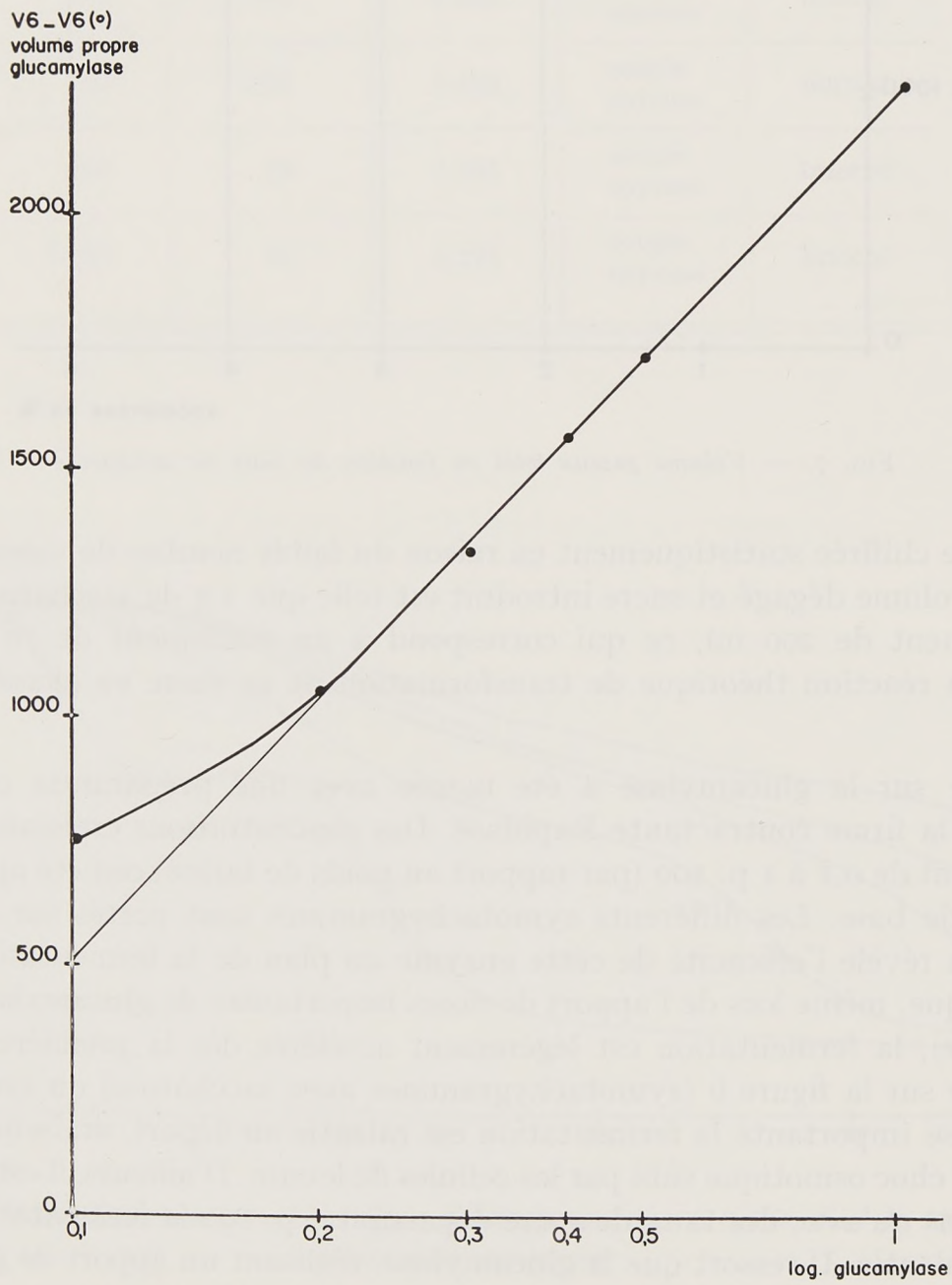


FIG. 9. — *Volume gazeux total, propre à la glucamylase, en fonction du logarithme des concentrations en glucamylase*

gressif au cours du temps, doit permettre l'obtention de produits finis relativement sucrés, ce qui s'avère difficile sinon impossible dans le cas des formulations traditionnelles comportant du saccharose.

A partir de ces zymotachygrammes a été calculé le volume de CO_2 propre à chaque concentration d'enzyme. Ces résultats sont portés sur la figure 9, en fonction du logarithme de la concentration de glucamylase. Hormis dans le cas de la plus faible dose, la relation est linéaire ; ainsi le volume dégagé, donc en fait la quantité de glucose formé au sein de la pâte, suit sensiblement une loi logarithmique.

Sur la figure 10 sont portés, en échelle normale, les volumes propres à la glucamylase et ceux propres au saccharose. Dans le cas du saccharose est retrouvée la proportionnalité entre volume dégagé et quantité de saccharose. En abscisse apparaît une double échelle, d'une part celle correspondant au saccharose, d'autre part celle relative à la glucamylase. Les échelles en abscisses ont été choisies de telle façon que les deux courbes se superposent de la façon la plus satisfaisante possible. Le rapport de ces échelles est de 1 (pour l'enzyme) à 10 (pour le saccharose). En conséquence, la glucamylase produit l'équivalent en saccharose de 10 fois son propre poids et ce, lors de fermentations d'une durée de 6 heures.

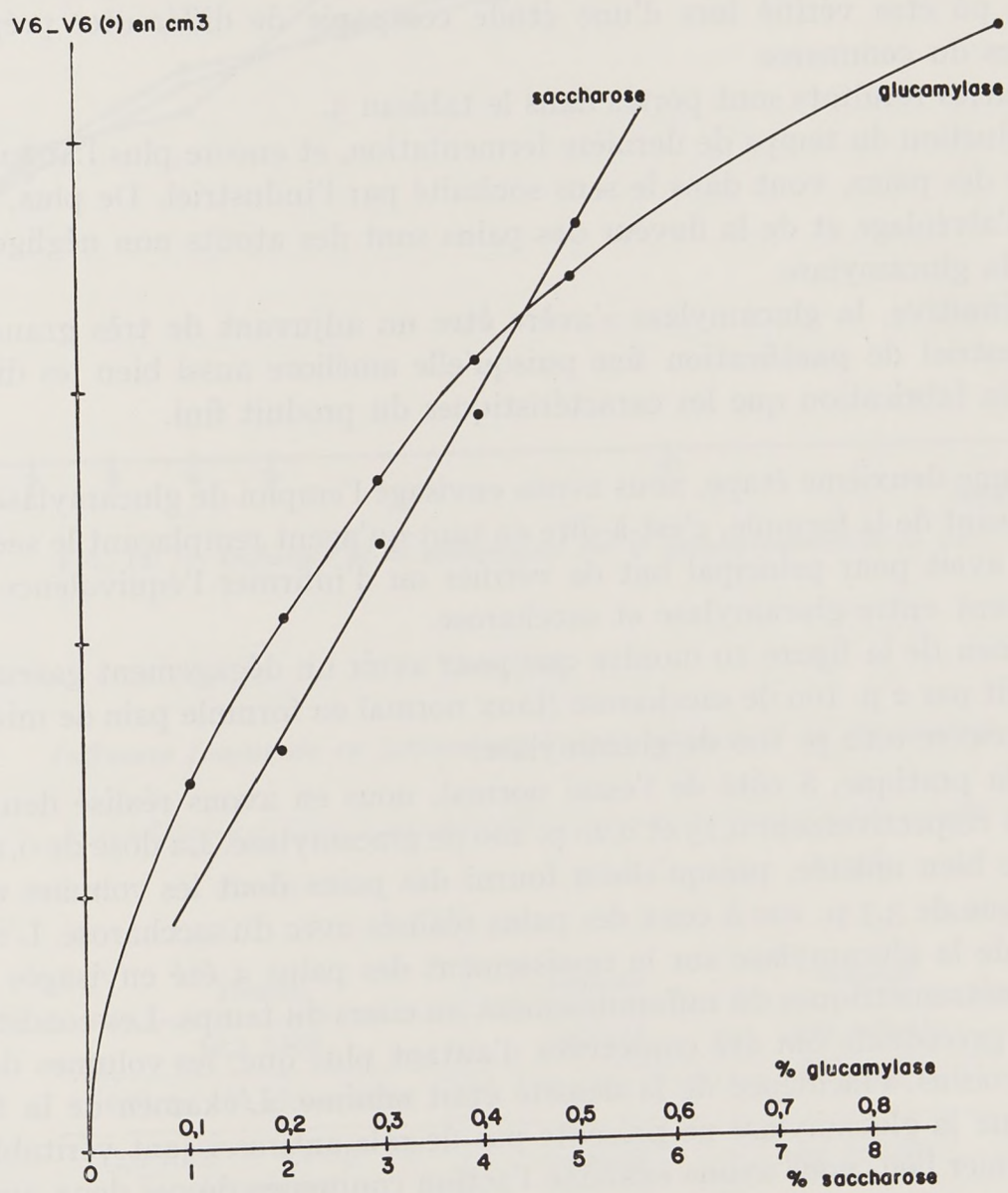


FIG. 10. — *Relation entre volume dégagé et taux de glucamylase et de saccharose*

En conclusion, sur le plan de la fermentation panaire, la glucamylase se révèle très efficace. Cette expérimentation a été confirmée par des fabrications effectuées selon l'essai de cuisson pain de mie, mis au point par le CTU.

Dans la première partie des essais, la glucamylase a été testée en tant qu'adjuvant. Pour cela, des taux croissants d'enzyme ont été ajoutés à la formule habituelle pain de mie. En plus des appréciations fournies par le technicien tout au long de la fabrication, seront relevés en particulier les paramètres suivants : temps de dernière fermentation, c'est-à-dire temps nécessaire pour que la pâte atteigne un volume donné et constant, avant mise au four ; volume des pains ; appréciations organoleptiques.

Au cours du pétrissage, la consistance mesurée au farinographe Brabender augmente légèrement comme le montre la figure 1 : à un farinogramme témoin de consistance 380 UB correspond, lors de l'adjonction de 5 p. 100 de glucose, une consistance de 400 UB. Ce fait est bénéfique pour l'industriel fabricant de produit frais puisque, pour avoir une même consistance de pâte, il devra accroître son hydratation. De plus, il a été constaté que la glucamylase, à l'inverse des alpha-amylases, rend la pâte plus sèche en surface, donc plus « machinable », mais cela n'est vrai que dans la mesure où la préparation commerciale de glucamylase possède une pureté suffisante vis-à-vis des autres enzymes (alpha-amylases, protéases, etc.) ; ce point a pû être vérifié lors d'une étude comparée de différentes préparations industrielles du commerce.

Les autres résultats sont portés dans le tableau 3.

La réduction du temps de dernière fermentation, et encore plus l'augmentation du volume des pains, vont dans le sens souhaité par l'industriel. De plus, l'amélioration de l'alvéolage et de la flaveur des pains sont des atouts non négligeables en faveur de la glucamylase.

En définitive, la glucamylase s'avère être un adjuvant de très grand intérêt pour l'industriel de panification fine puisqu'elle améliore aussi bien les différentes phases de la fabrication que les caractéristiques du produit fini.

Dans une deuxième étape, nous avons envisagé l'emploi de glucamylase en tant que composant de la formule, c'est-à-dire en tant qu'agent remplaçant le saccharose. Ce travail avait pour principal but de vérifier ou d'infirmer l'équivalence trouvée précédemment entre glucamylase et saccharose.

L'examen de la figure 10 montre que pour avoir un dégagement gazeux égal à celui produit par 2 p. 100 de saccharose (taux normal en formule pain de mie), il faut mettre en œuvre 0,12 p. 100 de glucamylase.

Dans la pratique, à côté de l'essai normal, nous en avons réalisé deux autres comportant respectivement 0,15 et 0,20 p. 100 de glucamylase. La dose de 0,15 p. 100 s'est avérée bien ajustée, puisqu'elle a fourni des pains dont les volumes n'étaient supérieurs que de 3,3 p. 100 à ceux des pains réalisés avec du saccharose. L'influence éventuelle de la glucamylase sur le rassissement des pains a été envisagée par des mesures pénétrométriques du raffermissement au cours du temps. Les conditions des trois essais précédents ont été conservées d'autant plus que, les volumes des pains étant très voisins, l'incidence de la densité était minime. L'examen de la figure 11 démontre que la glucamylase ne présente pas de rôle antirassissant véritable.

En dernier lieu, nous avons examiné l'action conjuguée de ces deux amylases : l'amylase bactérienne et la glucamylase.

A l'aide du zymotachygraphe Chopin, nous avons constaté qu'au niveau de la fermentation les actions de chaque amylase étaient cumulatives, quel que soit le rapport des concentrations entre les deux amylases. Au niveau de la fabrication, nous avons conclu, comme le montre le tableau 4, que la glucamylase pouvait, dans certaines conditions, compenser les effets néfastes dus aux alpha-amylases.

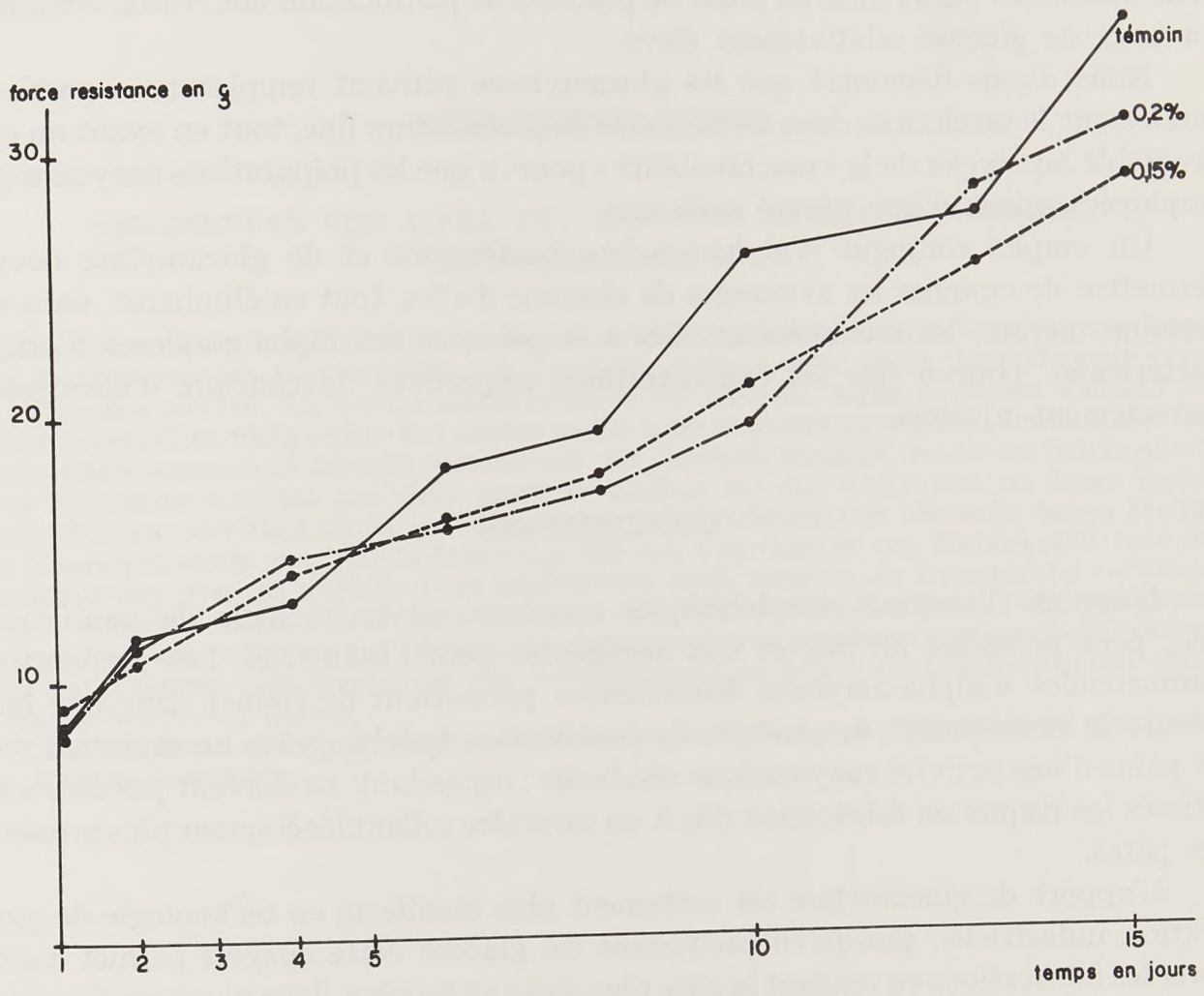


FIG. 11. — *Influence de la glucamylase sur le raffermissement de la mie*

TABLEAU 4

Influence conjuguée en fabrication d'alpha-amylase et de glucamylase

Essais	Pâte	Mie
Témoin	normale	normale
12,5 SKB	collante	très collante
0,01 p. 100 glucamylase	sèche	sèche
12,5 SKB + 0,01 p. 100 glucamylase	normale	non collante

Les conclusions de l'ensemble de cette étude peuvent se résumer comme suit.

Les préparations d'alpha-amylases bactériennes ont un rôle antirassissant notable, mais il ne faut cependant pas minimiser les risques qui peuvent apparaître au niveau de la fabrication.

Les glucamylases utilisées en tant qu'adjuvant peuvent améliorer sensiblement la fabrication et la qualité du produit fini. De plus, nous avons vu que leur emploi peut déboucher sur la mise au point de produits de panification nouveaux, contenant un taux de glucose relativement élevé.

Nous avons démontré que les glucamylases peuvent remplacer en partie ou totalement le saccharose dans les formules de panification fine, tout en ayant un effet favorable au niveau de la « machinabilité » pourvu que les préparations enzymatiques employées soient d'une pûreté suffisante.

Un emploi conjugué d'alpha-amylase bactérienne et de glucamylase devrait permettre de cumuler les avantages de chacune d'elles, tout en éliminant, dans une certaine mesure, les inconvénients liés à la présence des alpha-amylases d'origine bactérienne, pourvu que les concentrations respectives de chacune d'elles soient correctement ajustées.

CONCLUSIONS

L'apport d'enzymes amylolytiques exogènes, en technologie de panification fine, peut présenter un intérêt non négligeable pour l'industriel. Les préparations commerciales d'alpha-amylases bactériennes permettent de freiner dans une large mesure le rassissement de produits de panification fraîche, grâce au maintien dans les pains d'une activité enzymatique résiduelle ; cependant, ne doivent pas être sous-estimés les risques en fabrication dûs à un caractère collant légèrement plus prononcé des pâtes.

L'apport de glucamylase est nettement plus manifeste en technologie de panification industrielle, puisqu'en produisant du glucose cette enzyme permet d'améliorer les fabrications en rendant la pâte plus sèche au toucher donc plus « machinable », mais surtout d'activer de façon notable l'activité fermentative de la levure boulangère, donc de réduire largement les temps de fermentation. De plus, elle devrait être source d'innovation en permettant la mise au point de produits de panification relativement sucrés, ce qui est pratiquement impossible sans emploi d'enzymes pour un diagramme de fabrication court.

Enfin, une adjonction conjuguée de ces deux enzymes amylolytiques apparaît comme optimale industriellement puisque les avantages de chacune d'elles sont cumulés.

SUMMARY

THE USE OF α-AMYLASES AND GLUCAMYLASE IN BAKERY

Bacterial α-amylases, in addition to their dextrinizing effect, are interesting in breadmaking because they act as antistaling agents : they are not completely inhibited during the baking process and are opposed to starch retrogradation. Glucamylase destroying starch directly into glucose is

good for proofing because glucose is directly assimilible by baker's yeast. Studies showed that enzymatic preparations of glucamylase could be used by the manufacturer (if there is a lowering of price) :

— as additive : very low amounts of this enzym improve all processing stages ;

— as formula ingredient, for substituting the whole or a part of the sucrose in the formula.

A comparative study of sucrose and glucamylase additions was realised and showed an equivalence of these two carbohydrates springs. Finaly the synergistic effect appearing when α-amylase and glucamylase are added together is discussed.

ZUSAMMENFASSUNG

VERWENDUNG VON ALPHA AMYLASEN UND AMYLOGLUKOSIDASEN IN FEINBACKWAREN

Die Verwendung von Bakterien — Alphaamylasen in Feinbackwaren ist nicht nur wegen ihrer dextrinisierenden Eigenschaften von Interesse, sondern auch wegen ihrer Wirkung gegen das Altbacken werden, die darauf zurückzuführen ist, dass die Alpha-Amylasen während des Backprozesses nicht völlig inaktiviert werden und sich der Stärkeretrogradation, die ein Hauptfaktor des Altbackenwerdens darstellt, widersetzen. Die Amyloglukosidase, welche die Stärke unmittelbar in Glukose umsetzt, hat einen positiven Einfluss auf den Gärprozess, da dieser Zucker unmittelbar von der Bäckerhefe assimiliert wird. Die durchgeführten Versuche haben gezeigt, dass Enzympräparate von Amyloglukosidase für den Fabrikanten von Nutzen sind (mit der Einschränkung, dass der aktuelle Preis herabgesetzt wird) wenn sie als Zusatzmittel verwendet werden, wobei sie schon bei niedrigen Einsätzen eine Verbesserung sämtlicher Fabrikationsphasen erreichen, oder wenn sie als Austauschstoff für Saccharose eingesetzt werden. Vergleichsversuche mit Zusätzen von Saccharose und Amyloglukosidase heben die Gleichwertigkeit dieser beiden Zuckerquellen hervor.

Zum Abschluss wird die Synergie von Alpha-amylase und Amyloglukosidase bei gleichzeitigem Einsatz diskutiert.

PROTÉASES

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 193-203.

PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DES PROTÉASES BACTÉRIENNE OU FONGIQUE

R. DELECOURT

Société Rapidase,
59113 Seclin

INTRODUCTION

La purification des protéases a été entreprise à partir des mêmes produits de base et des mêmes schémas de purification et d'analyse que les amylases (voir article précédent du même auteur). Nous ne mettons en évidence que les particularités de ces procédés.

A. — PROTÉASE BACTÉRIENNE ALCALINE DU *BACILLUS SUBTILIS*

Méthode de purification

Lors de l'adsorption de l'amylase précipitée du *Bacillus subtilis* sur QAE Sephadex, la protéase alcaline n'est pas adsorbée et passe rapidement après le front du solvant (fig. 1). Cette fraction est relativement pure et une simple chromatographie sur Biogel P 60 permet d'éliminer des protéines inactives.

Résultats

	Activités protéolytiques (PC) (en PC/g)	Activités amylasiques (ICC) (en U/g)	ICC/PC
	—	—	—
Milieu de fermentation	3 500	5 000	1,4
Précipité méthanolique	150 000	15 000	0,1
Protéase purifiée	820 000	24	0,000 03

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 68-01-223-02-212-75-01) que nous remercions de son aide.

L'électrophorèse sur papier (tampon véronal 0,1 M, pH 8,6, 140 volts, 90 mn) montre une bande principale avec une petite bande de protéines inactives.

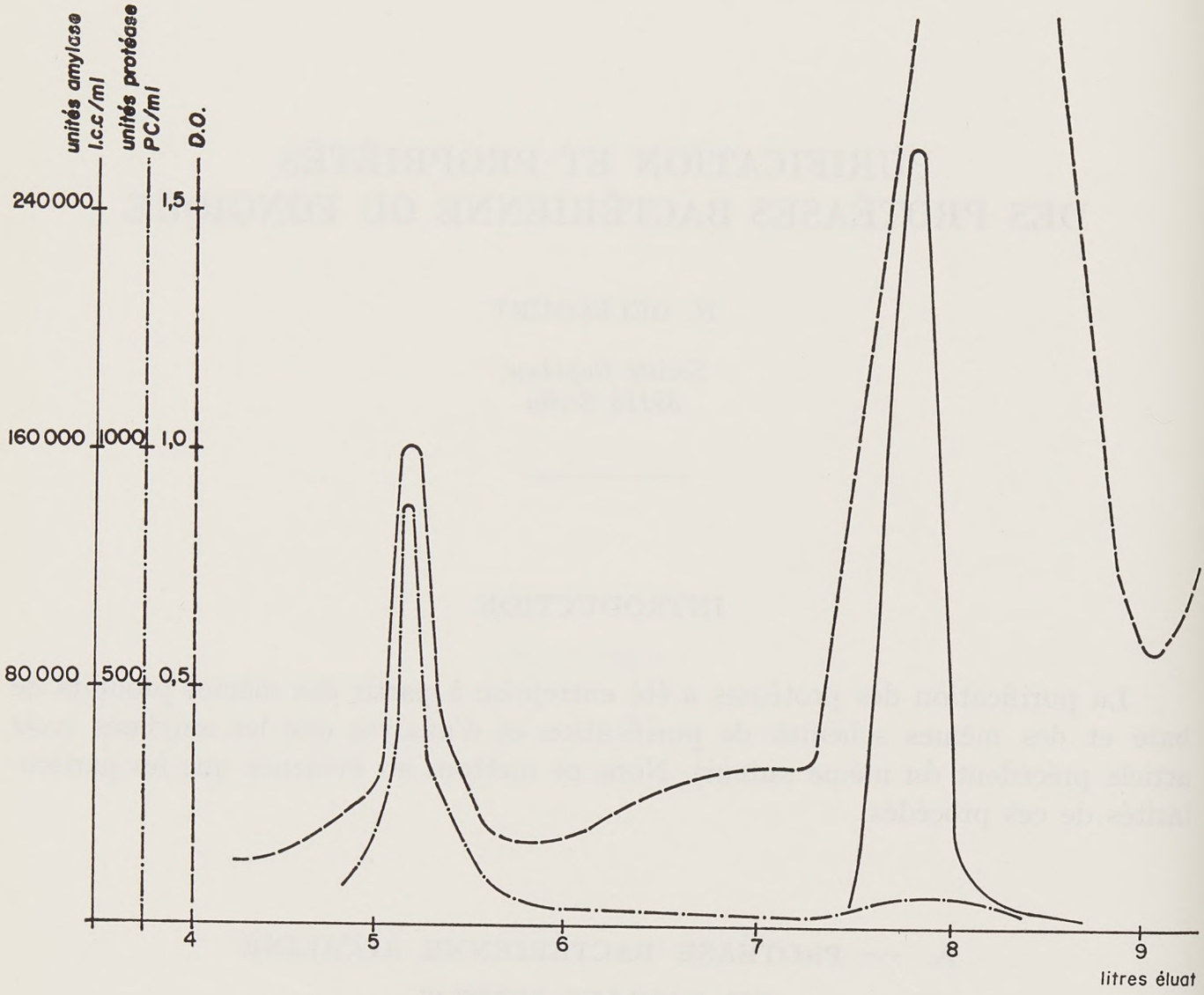


Fig. 1. — *Séparation amylase-protéase sur QAE Sephadex*

L'électrofocalisation montre aussi 2 bandes dont l'une correspond à la protéase et l'autre correspond à des protéines inactives avec traces d'amylase (fig. 2).

Propriétés de la protéase bactérienne alcaline

La protéase alcaline du *Bacillus subtilis* est une protéase type sérine et non influencée par la présence de sel de calcium. Nous avons vérifié qu'elle est inactivée totalement par le diisopropylfluorophosphate et non par l'EDTA. Son pH optimum (fig. 3) en présence de substrat caséine est vers 9,0, mais sa courbe d'activité est très aplatie et elle a encore 80 p. 100 de son activité à pH 7,0. Sa zone de pH (activité 50 p. 100) est comprise entre pH 6,0 et pH 11,0. Sa température optimale est 55°C et elle est rapidement inactivée à 70°C (fig. 4). Son activité de digestion du gluten est assez faible, comparée à d'autres protéases et spécialement à la protéase neutre du *subtilis*. Son action sur la viscosité de la pâte est insuffisante pour supprimer l'élasticité des pâtes type biscuiterie. Sur gluten, sa courbe de pH est très aplatie dans la zone de pH compris entre 5,0 et 7,5. Elle est inactive en-dessous de pH 4,0.

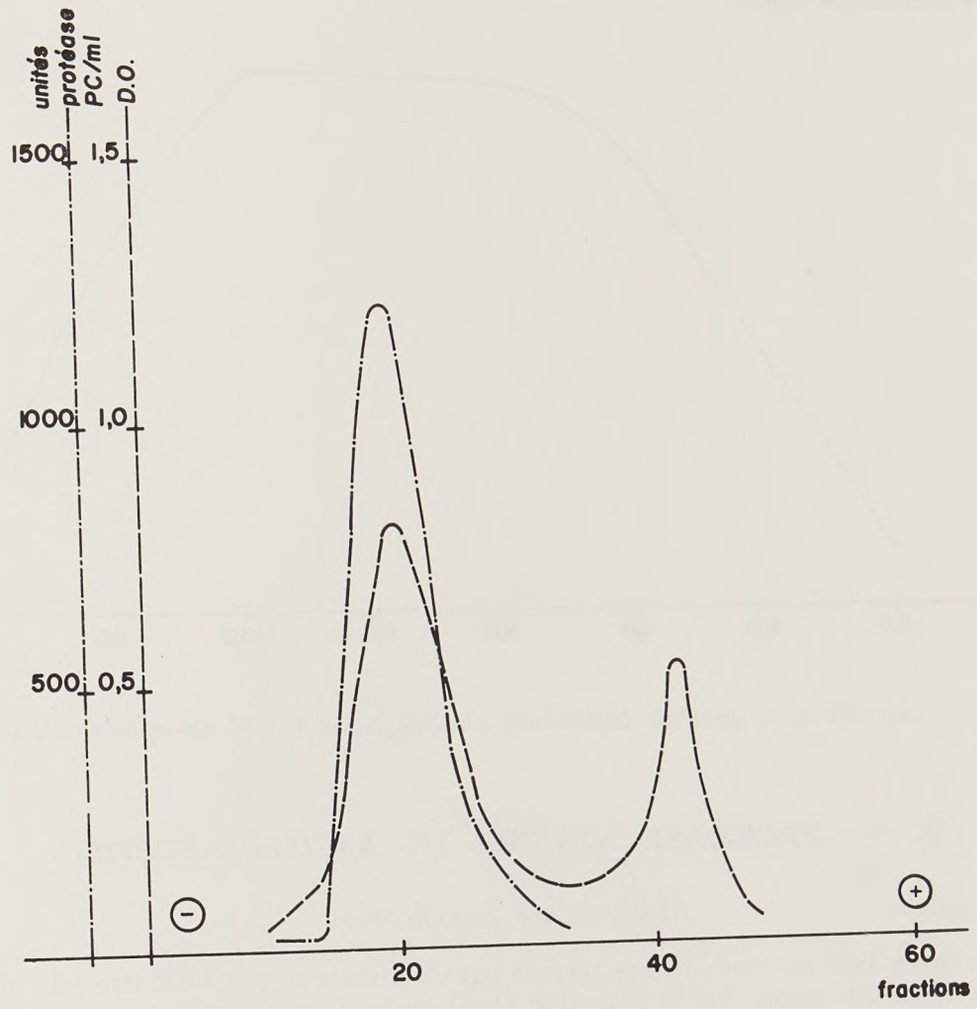


FIG. 2. — *Electrofocalisation. Protéase bactérienne alcaline pH 7 à 9*

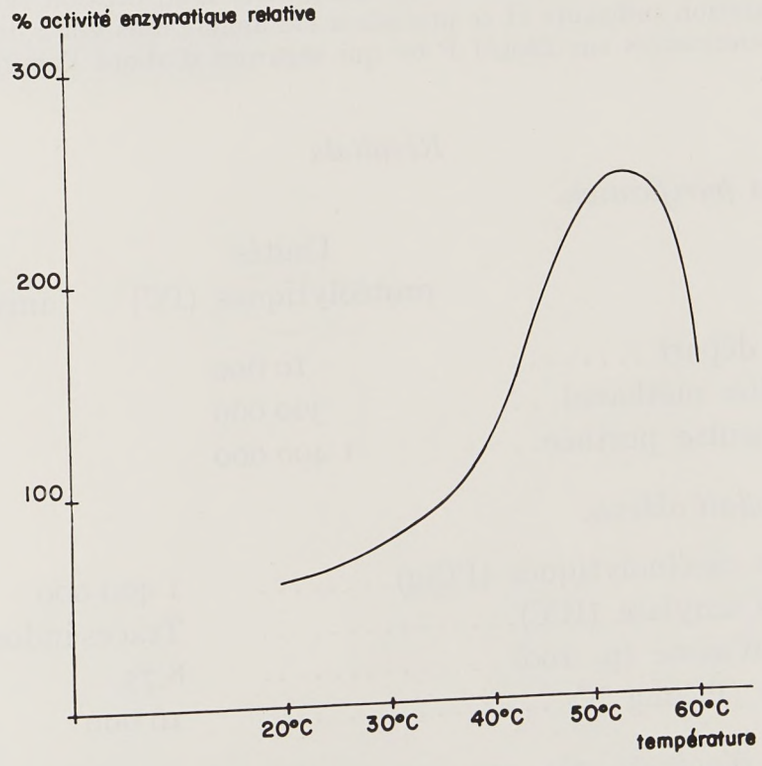


FIG. 3. — *Activité de la protéase bactérienne alcaline, selon la température, sur caséine*

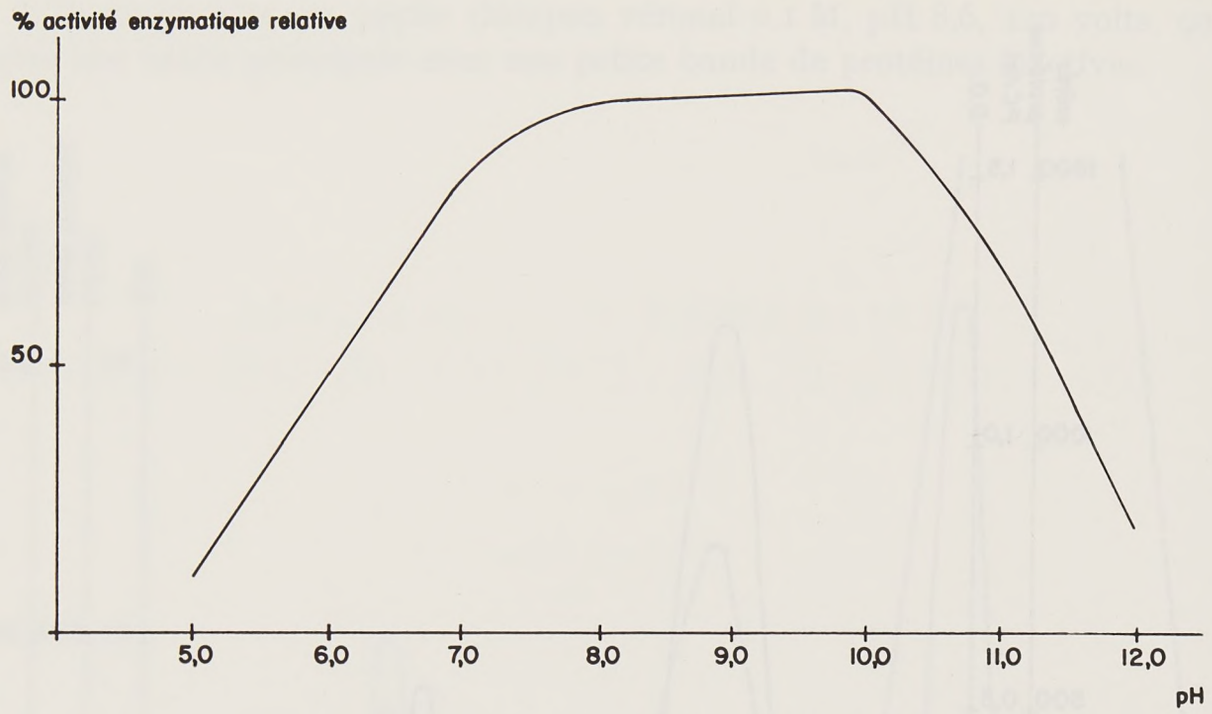


FIG. 4. — *Activité de la protéase bactérienne alcaline, selon le pH du milieu, sur caséine*

B. — PROTÉASE NEUTRE DU *BACILLUS SUBTILIS*

Méthode de purification

Le milieu de culture est privé de ses germes par clarification, par formation de phosphate de chaux, suivie d'une filtration. Après filtration stérilisante, la solution est concentrée sous vide de façon à réduire son volume au quart. On précipite alors la protéase neutre par addition de 3 volumes de méthanol à la solution. Après séchage, le précipité est redissous, filtré et dessalé sur Biogel P 10.

Par suite de la sensibilité de la protéase à la dénaturation, tous les traitements sur colonne sont effectués en présence d'acétate de calcium 0,5 g/litre. L'adsorption sur QAE Sephadex n'a pas donné une séparation suffisante et ce procédé a été abandonné. On a donc effectué plusieurs chromatographies successives sur Biogel P 60 qui séparent d'abord l'amylase puis la protéase alcaline (fig. 5 et 6).

Résultats

1. *Évolution de la purification.*

	Unités protéolytiques (PC)	Unités amylase (ICC)
Milieu de départ	10 000	2 000
Précipitation méthanol ..	300 000	20 000
Protéase neutre purifiée..	1 400 000	30

2. *Analyse du produit obtenu.*

Unités caséinolytiques (PC/g).....	1 400 000
Unités amylase (ICC).....	Traces indosables
Taux d'azote (p. 100)	8,75
Unités (PC/mg N)	16 000

La présence d'acétate n'a pas permis d'obtenir un produit d'activité plus importante.

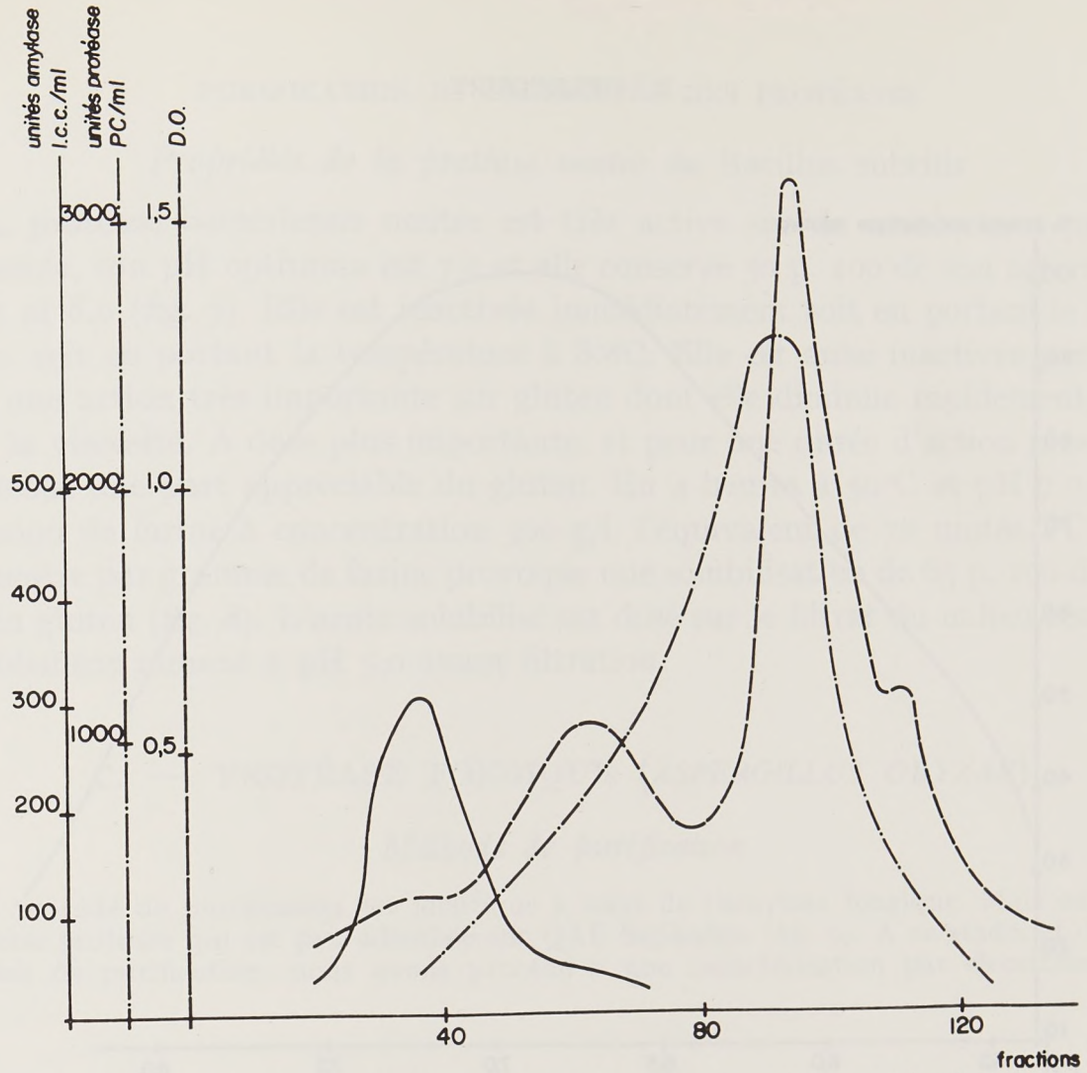


FIG. 5. — *Protéase bactérienne neutre* (1re chromatographie sur biogel P 60)

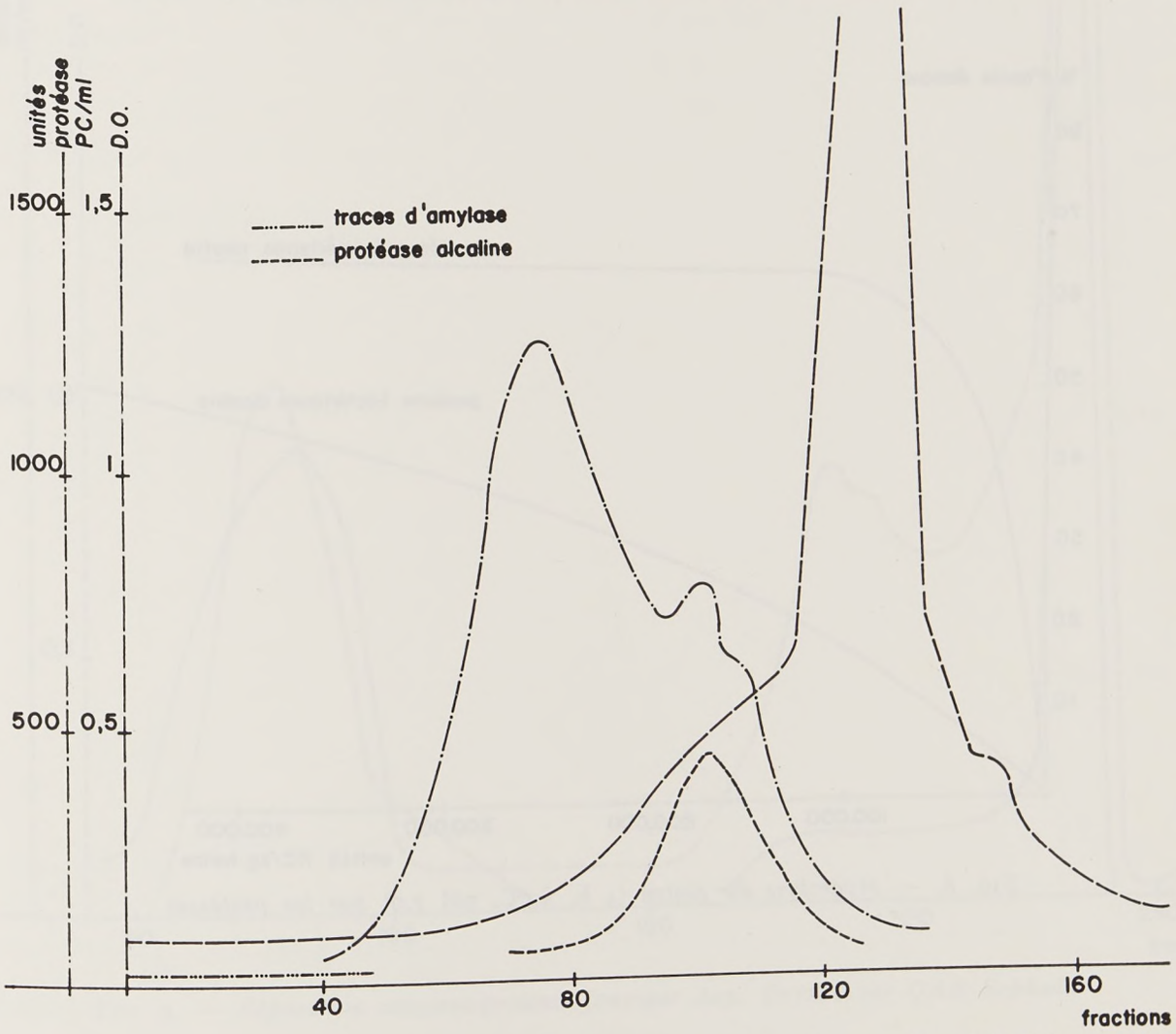


FIG. 6. — *Protéase bactérienne neutre* (2e chromatographie sur biogel P 60)

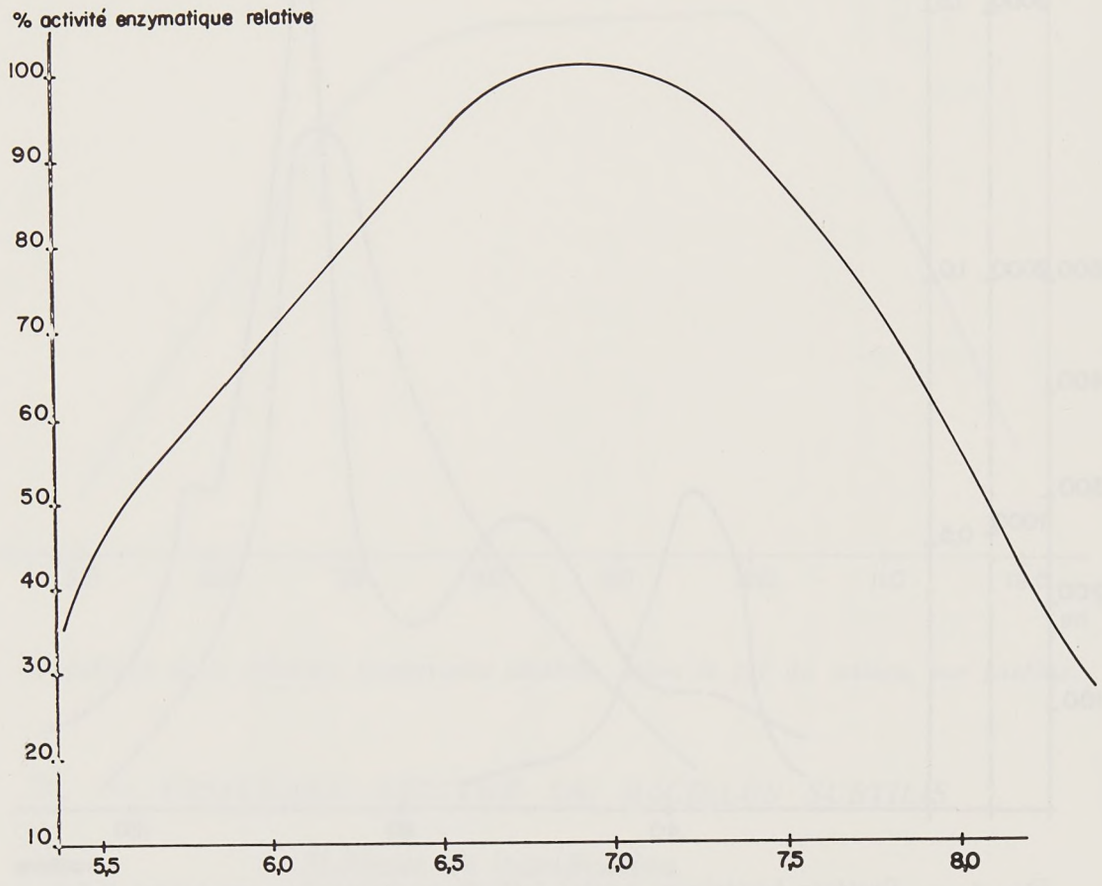


FIG. 7. — *Influence du pH sur l'activité de la protéase bactérienne neutre*

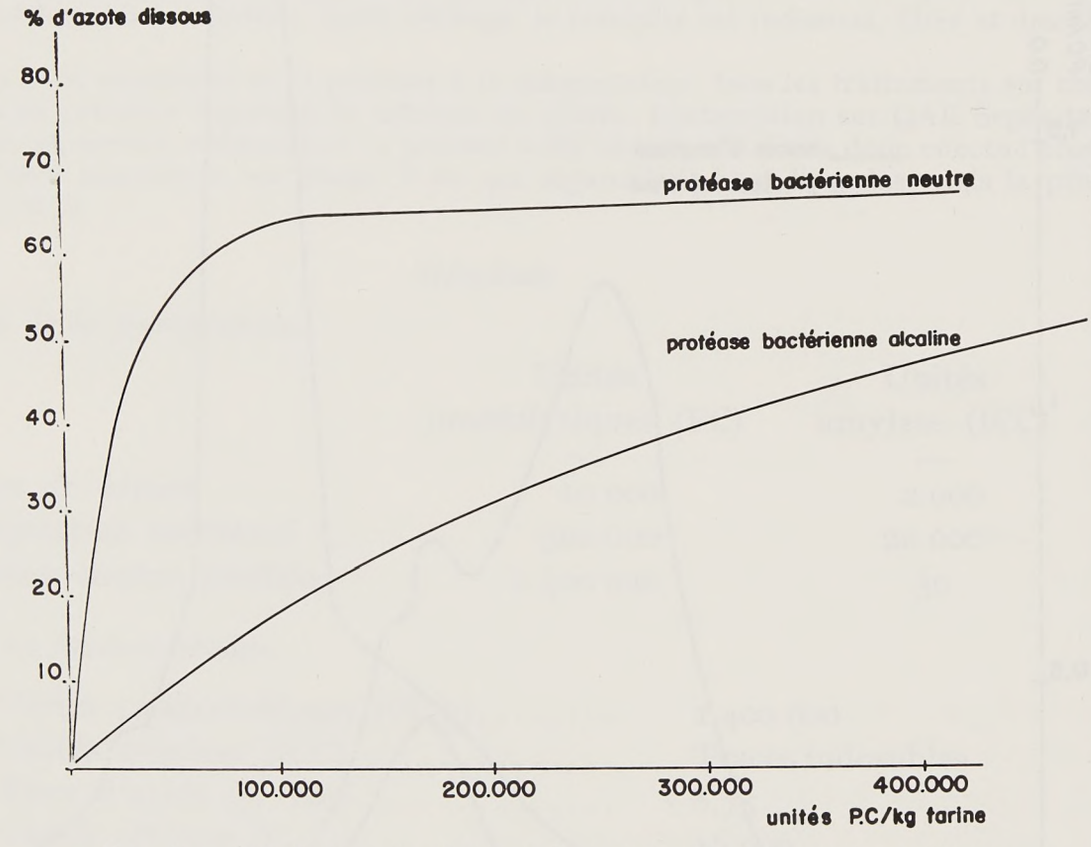


FIG. 8. — *Hydrolyse du gluten* (4 h, 50°C, pH 7,0) *par les protéases*

Propriétés de la protéase neutre du Bacillus subtilis

La protéase bactérienne neutre est très active sur de nombreuses protéines. Sur caséine, son pH optimum est 7,0 et elle conserve 50 p. 100 de son activité entre pH 5,5 et 8,0 (fig. 7). Elle est inactivée immédiatement soit en portant le milieu à pH 4,0, soit en portant la température à 80°C. Elle est aussi inactivée par EDTA. Elle a une action très importante sur gluten dont elle diminue rapidement l'élasticité et la viscosité. A dose plus importante, et pour une durée d'action plus longue, elle dissout une part appréciable du gluten. En 4 heures à 50°C et pH 7,0 sur une suspension de farine à concentration 300 g/l, l'équivalent de 70 unités PC en protéase neutre par gramme de farine provoque une solubilisation de 65 p. 100 de l'azote total du gluten (fig. 8). L'azote solubilisé est dosé sur le filtrat du milieu réactionnel préalablement ramené à pH 5,0 avant filtration.

C. — PROTÉASE FONGIQUE (*ASPERGILLUS ORYZAE*)

Méthode de purification

Le procédé de purification est identique à celui de l'amylase fongique. Mais on recueille la fraction protéase qui est peu adsorbée sur QAE Sephadex (fig. 9). A ce stade, et devant les difficultés de purification, nous avons procédé à une caractérisation par électrofocalisation.

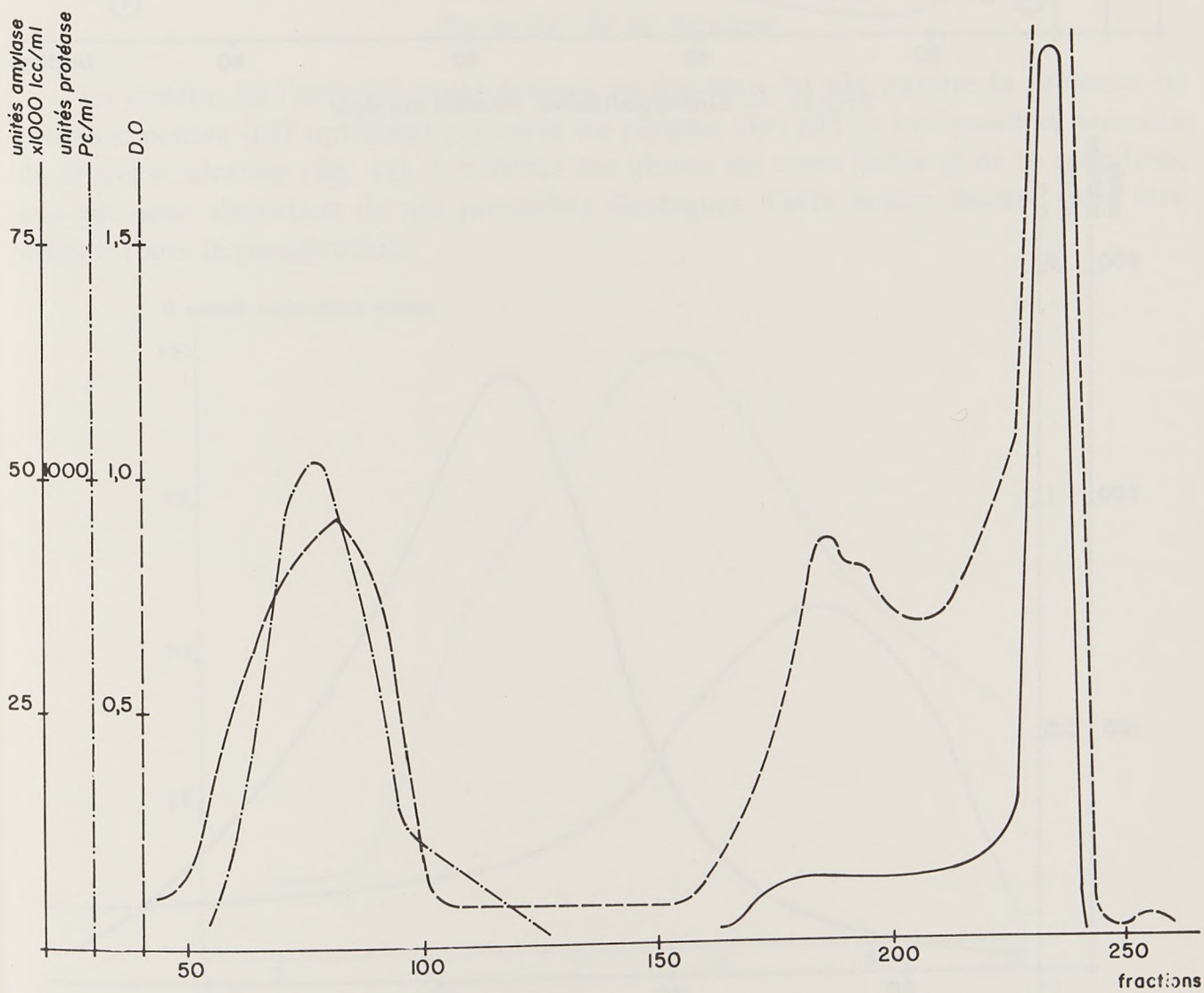


FIG. 9. — *Séparation amylase-protéase fongique* Asp. Oryzae *sur QAE Sephadex*

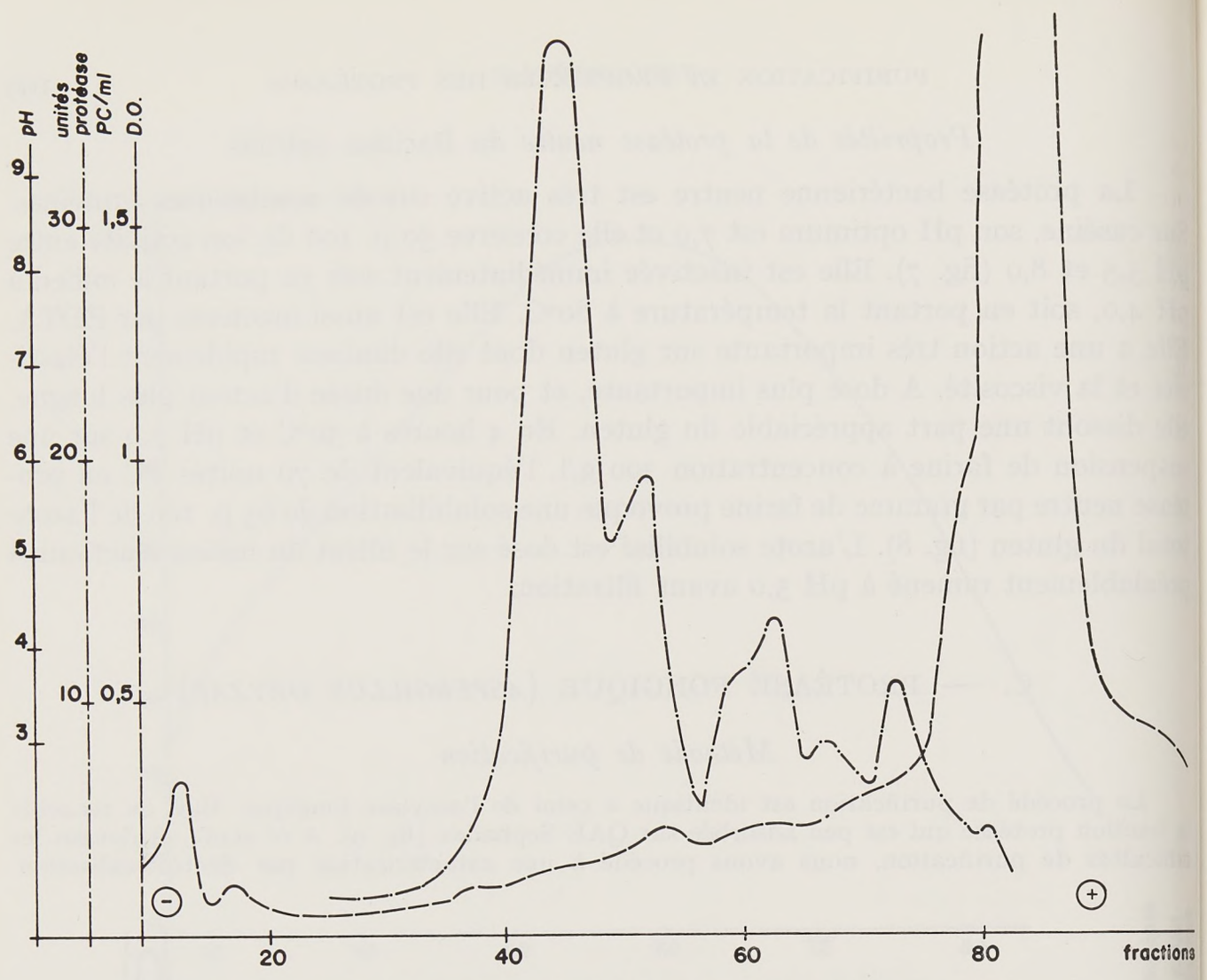


FIG. 10. — *Electrofocalisation. Protéase fongique*

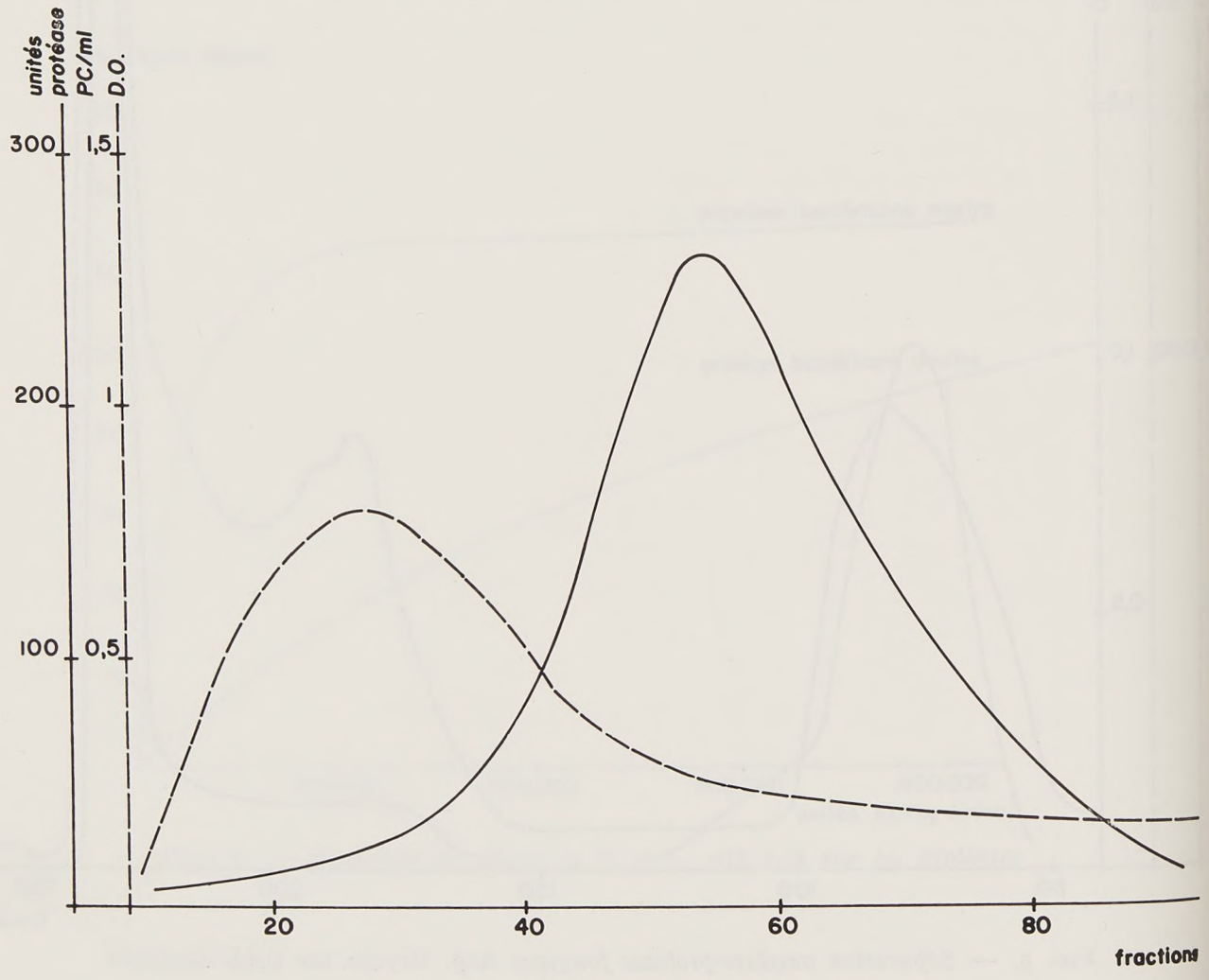


FIG. 11. — *Protéase* Aspergilus Oryzae.
Séparation sur biogel P 60

Les résultats confirment les connaissances classiques à savoir que l'*Aspergillus oryzae* peut sécréter 4 protéases différentes : une acide, deux neutres et une alcaline. Nous obtenons 4 pics électrophorétiques pourvus d'activité protéolytique (fig. 10).

Nous avons alors cherché à isoler la protéase neutre la plus importante au point de vue activité. Une chromatographie ultérieure sur Biogel P 60 permet de séparer des protéines inactives (fig. 11) et d'étaler un peu les pics des protéases. On élimine très mal la protéase alcaline. Après lyophilisation du produit obtenu, on s'aperçoit que ce dernier contient très peu d'azote (environ 2 p. 100) mais une quantité énorme de polysaccharides qui ne sont pas éliminés par des chromatographies successives.

Résultats

Nous avons obtenu un échantillon ayant la composition suivante :

Protéase fongique *Aspergillus oryzae* :

Unités caséinolytiques (PC/g)	100 000
Unités amylase (ICC/g)	1 000
Taux d'azote (p. 100)	2,27
Taux de sucre environ (p. 100).....	75
Unités (PC/mg N)	4 000

La protéase neutre est encore contaminée par la présence d'une certaine quantité de protéase alcaline.

Propriétés de la protéase

La courbe de l'activité protéolytique en fonction du pH montre la présence de protéase neutre (pH optimum 7,5) avec un plateau vers pH 10 indiquant la présence de protéase alcaline (fig. 12). L'activité sur gluten est assez faible et ne se manifeste que par une altération de ses propriétés élastiques. Cette action limitée peut être utilisée dans la panification.

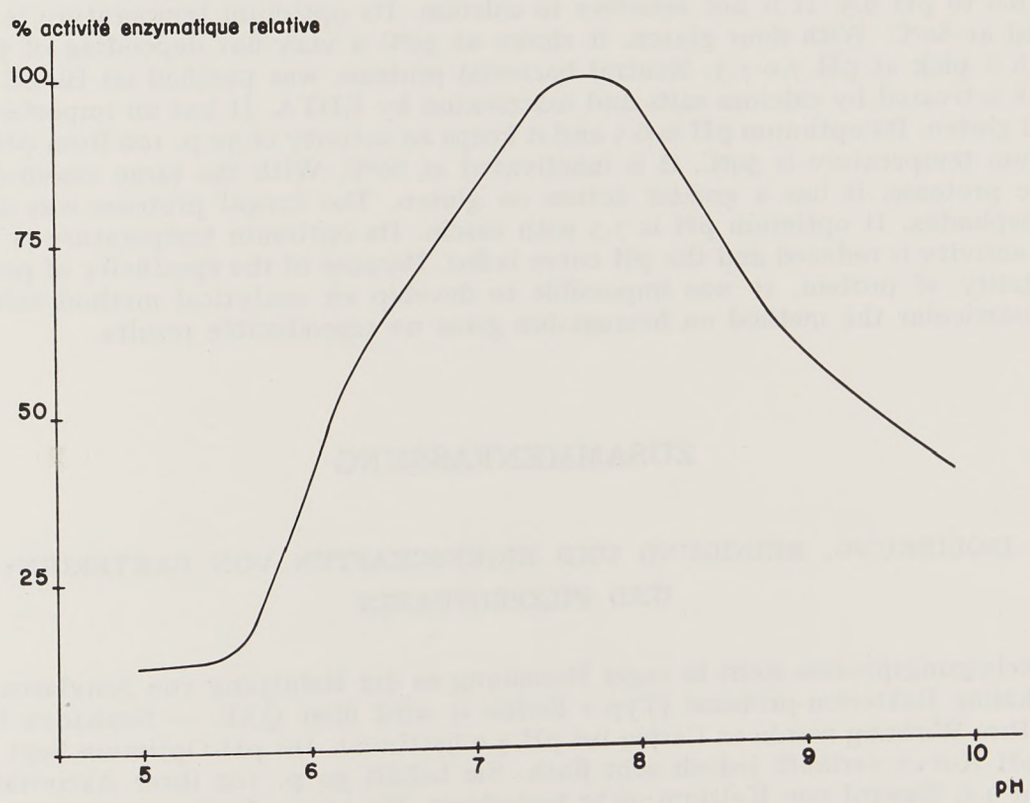


FIG. 12. — *Influence du pH sur l'activité de la protéase fongique*

DISCUSSION

Il est très intéressant de noter la différence d'action des protéases neutre et alcaline du *Bacillus subtilis* sur le gluten. A égalité d'unité enzymatique déterminée sur caséine, on observe que la protéase neutre hydrolyse très fortement le gluten et non la protéase alcaline. Le choix du pH d'action ne permet pas d'expliquer cette différence qui provient de la différence de spécificité et de propriété des deux enzymes. En effet, la protéase alcaline a une spécificité beaucoup plus large que la protéase neutre qui hydrolyse les liaisons peptidiques dans lesquelles le groupe aminé appartient à un acide aminé hydrophobe. Par exemple, dans la chaîne B oxydée de l'insuline, la protéase neutre hydrolyse 5 liaisons et la protéase alcaline en hydrolyse 18. Il est possible que la protéase alcaline soit inhibée par certains inhibiteurs spécifiques contenus dans les céréales.

L'examen des propriétés vis-à-vis du gluten montre que seule la protéase neutre a une action suffisante pour modifier profondément les propriétés élastiques du gluten. Mais l'effet obtenu fera réserver son utilisation à la biscuiterie.

SUMMARY

ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF BACTERIAL AND FUNGAL PROTEASES

The purification process is a function of that used for amylases. The basic bacterial protease (serine type) is purified on QAE Sephadex at pH 8. It is titrated by study of its effect on casein at pH 7. Its optimum pH is 8.5-9.0, but the curve is very flat. It keeps 50 p. 100 of its activity from pH 6.0 to pH 9.5. It is not sensitive to calcium. Its optimum temperature is 50°C ; it is inactivated at 80°C. With flour gluten, it shows at 30°C a very flat depending of pH activity curve with a pick at pH 7.0-7.5. Neutral bacterial protease was purified on Biogel P 60. This protease is activated by calcium salts and inactivated by EDTA. It has an important effect on casein and gluten. Its optimum pH is 6.5 and it keeps an activity of 50 p. 100 from pH 5.8 to 8.0. Its optimum temperature is 50°C, it is inactivated at 80°C. With the same caseinolytic power than basic protease, it has a greater action on gluten. The fungal protease was also purified on QAE Sephadex. It optimum pH is 7.5 with casein. Its optimum temperature is 50°C. With gluten its activity is reduced and the pH curve is flat. Because of the specificity of proteases and the variability of protein, it was impossible to develop an analytical method suitable in all cases. In particular the method on hemoglobin gives no reproducible results.

ZUSAMMENFASSUNG

ISOLIERUNG, REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN VON BAKTERIEN- UND PILZPROTEASEN

Der Reinigungsprozess steht in enger Beziehung zu der Reinigung von Amylasen. Die sogenannte alkaline Bakterien-protease (Typ « Serine ») wird über QAE — Sephadex bei pH 8,0 gereinigt. Ihre Wirkung wurde an Casein bei pH 7,0 bestimmt. Ihr pH-Optimum liegt bei 8,5 bis 9,0 ; die pH-Kurve verläuft jedoch sehr flach. Sie behält 50 p. 100 ihrer Aktivität zwischen pH 6,0 und 9,5. Siewird von Kalzium nicht beeinflusst. Die optimale Temperatur liegt bei 50°C. Sie wird bei 80°C inaktiviert. Bei 30°C und Anwesenheit von Mehlkleber ist die Aktivitätskurve

in bezug auf den pH Wert sehr flach mit einem Stichpunkt bei einem pH von 7,0 bis 7,5. Die neutrale Bakterien protease wurde über Biogel P 60 gereinigt. Es handelt sich um eine Protease, die durch Kalziumsalze aktiviert und durch EDTA inaktiviert wird. Sie besitzt eine starke Aktion auf Casein und Kleber. Ihr pH-Optimum liegt bei 6,5 und der pH-Bereich, in dem 50 p. 100 ihrer Aktivität beibehalten wird, erstreckt sich zwischen 5,8 und 8,0. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 50°C. Sie wird bei 80°C inaktiviert. Im Vergleich zur alkalinen Protease, bei gleichem caseinolytischem Vermögen, besitzt sie eine sehr viel stärkere Aktion auf den Kleber. Die Pilzprotease wurde gleichfalls über QAE-Sephadex gereinigt. Ihr pH-Optimum bei Wirkung auf Casein liegt bei 7,5. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 50°C. Die Aktion auf Kleber ist gering und die pH-Kurve verläuft verhältnismässig flach. Wegen der besonderen Eigenschaften und der extremen Variierung der Proteine, war es praktisch unmöglich, eine für alle Fälle anwendbare Bestimmungsmethode auszuarbeiten. Insbesondere liefert die Hämoglobinmethode sehr unterschiedliche und nicht reproduzierbare Werte.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 205-214.

ISOLEMENT, PURIFICATION ET PROPRIÉTÉS DE DEUX PROTÉASES DE *STREPTOMYCES*

A. BELLOC, J.-C. PALLA et J. VERRIER

Laboratoires de Recherches de la Société des Usines chimiques Rhône-Poulenc, 94 - Vitry sur Seine

RÉSUMÉ

Deux protéases originales ont été isolées à partir de cultures de *Streptomyces* et purifiées par précipitations fractionnées successives par l'acétone, par le sulfate d'ammonium puis par l'isopropanol. Leurs propriétés biochimiques et technologiques ont été ensuite étudiées.

La protéase 25 048 R. P., enzyme de *Streptomyces nebulosus* NRRL 3 864, est active en milieu légèrement alcalin (pH optimal : 8,0). Elle est relativement thermostable (température optimale : 60°C, encore plus de 50 p. 100 de l'activité à 70°C) et elle hydrolyse dans la caséine plus de liaisons peptidiques que la trypsine. Ajoutée à une pâte à pain de type français à une dose comprise entre 5 et 10 mg/kg, elle en rend le travail beaucoup plus facile (pâte très extensible et peu élastique) ; la fermentation est accélérée et la texture de la mie du pain obtenu est beaucoup plus régulière.

La protéase 25 462 R. P., enzyme de *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3 999, est active dans une zone étroite de pH en milieu légèrement acide (pH optimal : 6,8). Elle est thermolabile (température optimale : 25° à 30°C, moins de 10 p. 100 de l'activité à 40°C) et elle hydrolyse dans la caséine à peu près le même nombre de liaisons peptidiques que la trypsine. Ajoutée à une pâte de pain de type français à une dose inférieure à 5 mg/kg, elle en rend le travail beaucoup plus facile, sans influer sur la durée de fermentation. La texture de la mie du pain obtenu est beaucoup plus régulière.

INTRODUCTION

Le constituant protéique essentiel de la farine de blé est le gluten, qui lui confère des propriétés très spéciales, notamment au point de vue rhéologique. L'importance du réseau de gluten dans la préparation des produits cuits dérivés du blé est bien connue : pour le pain, ce réseau ne doit pas offrir trop de résistance aux gaz libérés par la fermentation tout en étant continu pour bien les retenir ; pour les

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 70-02-224-00-212-75-01 et 70-02-224-01-212-75-01) que nous remercions de son aide.

biscuits au contraire, pour que la pâte soit facilement façonnable et le produit fini friable, il est indispensable que le réseau de gluten ne soit pas continu. Le rôle des protéases peut donc être important, d'une part en panification si l'on emploie une farine riche en gluten (farine « forte ») ou si l'on désire obtenir un pain particulièrement moelleux, d'autre part en biscuiterie de façon très générale.

Le gluten étant très peu sensible aux protéases endogènes de la farine, de nombreux travaux ont porté depuis plus de 20 ans sur l'étude des protéases exogènes, spécialement des protéases bactériennes ou fongiques ; de bonnes analyses de ces travaux ont été données récemment (Reed, 1966 ; Petit et Audidier, 1967). Aujourd'hui l'emploi des protéases d'*Aspergillus oryzae* ou de *Bacillus subtilis* est très répandu aux États-Unis pour la préparation du pain ou des biscuits, en particulier des crackers. Les principaux avantages de cet emploi sont la diminution du temps de pétrissage, la facilité de travail des pâtes, le moelleux et la régularité de texture pour le pain, la friabilité pour les biscuits.

Il a été démontré de façon très nette que les résultats obtenus variaient largement en fonction de la nature des protéases utilisées (Pomeranz, Rubenthaler et Finney, 1966). Deux éléments peuvent, semble-t-il, expliquer cette diversité des résultats : la spécificité des protéases elles-mêmes, la spécificité des inhibiteurs de protéases présents dans les farines (Hites, Sandstedt et Schaumburg, 1951 ; Learmonth et Wood, 1963). C'est pourquoi il nous a paru intéressant de rechercher des protéases originales pour étendre la gamme des produits offerts aux techniciens de la panification et de la biscuiterie.

Nous avons ainsi pu isoler et purifier 2 protéases de *Streptomyces* qui ont des caractères fort différents et qui, d'après des essais technologiques préliminaires, pourraient avoir un certain intérêt dans les industries de cuisson des céréales.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Dosage des activités enzymatiques

1. *Activité protéolytique.*

Cette détermination est effectuée avec la caséine comme substrat, manuellement selon la technique de Kunitz (Rick, 1963 *a*) ou sur analyseur automatique selon le même principe (Heinicke *et al.*, 1967). Les peptides acido-solubles libérés sont dosés par spectrophotométrie à 280 nm. Les résultats sont exprimés soit en équivalents de tyrosine, soit en utilisant l'unité définie par Kunitz : 1 unité Kunitz (UK) est la quantité d'enzyme qui, dans les conditions du dosage, libère suffisamment de peptides acido-solubles pour que la densité optique du filtrat trichloracétique augmente de 1,000 en 1 minute.

2. *Activité estérolytique.*

Elle est déterminée avec l'ester éthylique de la benzoyl-arginine comme substrat, selon la technique spectrophotométrique (à 253 nm) mise au point pour la trypsine (Rick, 1963 *b*). Les résultats sont exprimés en unités internationales : 1 unité est la quantité d'enzyme qui, dans les conditions du dosage, hydrolyse 1 µmole de substrat par minute.

3. *Activité amylolytique.*

Pour ce dosage, on utilise l'amidon soluble comme substrat et la technique fondée sur le dosage des sucres réducteurs par l'acide dinitro-3,5 salicylique (Bernfeld, 1955).

Micro-organismes

Deux mille quatre-vingt-seize micro-organismes récemment isolés (*Streptomyces* et champignons filamenteux) ont été étudiés. Les 2 micro-organismes sélectionnés pour la production des 2 protéases originales sont 2 souches de *Streptomyces*. Elles ont été déposées au Northern Regional Research Laboratory (Peoria, U. S. A.) sous les dénominations suivantes :

S. nebulosus NRRL 3 864 (producteur de la protéase 25 048 R. P.),
S. hygroscopicus NRRL 3 999 (producteur de la protéase 25 462 R. P.).

Conditions de culture

La culture productrice de la protéase 25 048 R. P. est effectuée dans un fermenteur de 30 litres chargé avec les substances suivantes : distillers' solubles 100 g, haricots en grains 800 g, huile de soja 200 ml, chlorure de sodium 100 g, chlorure de cobalt hexahydraté 0,4 g, eau de ville complément à 19 litres. Le pH est ajusté à 8,20. On stérilise le milieu à 122°C pendant 40 minutes. Après refroidissement, on ajoute une solution stérile de : glucose monohydraté 100 g, eau de ville complément à 1 litre. On ensemence le bouillon ainsi obtenu (20 litres, pH = 6,70) avec 200 ml d'une culture en fiole agitée de *S. nebulosus* NRRL 3 864. La culture est effectuée à 25°C pendant 6 jours, en agitant à l'aide d'une turbine tournant à 440 tr/mn et en aérant avec un volume d'air stérile de 1 m^3/h. Le pH est alors de 6,90 et l'activité protéolytique du moût atteint 5,3 UK /ml.

La culture productrice de la protéase 25 462 R. P. est effectuée dans des conditions voisines avec le milieu suivant : corn-steep (à 50 p. 100 de matière sèche) 400 g, amidon partiellement hydrolysé 200 g, huile de soja 300 ml, carbonate de calcium 100 g, sulfate d'ammonium 40 g, chlorure de cobalt hexahydraté 0,4 g, eau de ville complément à 20 litres (pH ajusté à 6,4). Après stérilisation, on ensemence le bouillon (20 litres, pH = 6,95) avec 200 ml d'une culture en fiole agitée de *S. hygroscopicus* NRRL 3 999. La culture est effectuée à 26°C pendant 4 jours. Le pH est alors de 7,0 et l'activité protéolytique du moût atteint 2,7 UK/ml.

Isolement et purification des protéases

Le tableau 1 résume le schéma opératoire utilisé pour l'isolement et la purification des 2 protéases.

TABLEAU I

Schéma opératoire pour l'isolement et la purification des protéases 25 048 R. P. et 25 462 R. P.

Suite des opérations	Conditions propres à chaque protéase	
	25 048 R. P.	25 462 R. P.
1. Filtration	pH = 7,0	pH = 7,0
2. Concentration du filtrat	au 1/3 de son volume	au 1/5 de son volume
3. Dialyse à + 4°C	17 heures	17 heures
4. Précipitation par l'acétone à — 10°C	fraction 33-60 p. 100	70 p. 100
5. Précipitation par $(NH_4)_2SO_4$ à + 4°C	80 p. 100 de saturation	80 p. 100 de saturation
6. Dialyse à + 4°C	17 heures	17 heures
7. Précipitation par l'isopropanol à — 10°C	66 p. 100	66 p. 100
8. Séchage	2 mm Hg, 20°C	2 mm Hg, 20°C

Essais technologiques

L'influence des protéases en panification a été étudiée sur la préparation de pain « type français » ; les effets ont été notés, comparativement à des témoins, au niveau du travail des pâtes et au niveau des produits finis.

1. *Formule de base témoin.*

farine (ruban jaune des Grands Moulins de Paris)	1 kg
levure	20 g
sel	22 g
eau	630 ml

2. *Conditions de panification.*

Température de base = 56°C (température farine + température ambiante + température eau).
Pétrissage intensifié : frasage 2 mn à 55 tr/mn, pétrissage 18 mn à 80 tr/mn.
Pointage (1re fermentation) : 1 h 15 mn.
Façonnage en pâtons de 100 g.
Apprêt (2e fermentation) : 2 h 15 mn.
Cuisson en moules : température sole 265°C
température voûte 270°C.

3. *Examens.*

Après ressuage, le volume des pains est déterminé avec un mesureur volumétrique à graines.
Les temps d'apprêt sont déterminés au zymotachygraphe Chopin qui permet également d'apprécier la tolérance de la pâte et la rétention de CO_2.

RÉSULTATS

Rendement et purification

Le tableau 2 indique le rendement d'extraction (gramme de protéase purifiée extraite par litre de bouillon de culture) et les activités enzymatiques des préparations purifiées des 2 enzymes 25 048 R. P. et 25 462 R. P. comparées à celles de la trypsine cristallisée (produit Nutritional biochemical Corporation).

TABLEAU 2

Rendement d'extraction.
Activités enzymatiques des protéases 25 048 R. P. et 25 462 R. P. purifiées

Protéase étudiée	Rendement d'extraction (g/l)	Activités enzymatiques		
		Protéolytique UK/g	Estérolytique UE/g	Amylolytique
25 048 R. P.	0,68	3 800	8 000	nulle
25 462 R. P.	0,2	2 800	1 600	—
Trypsine		5 150	40 000	—

La purification n'a été poussée pour aucune des 2 enzymes au stade de la pureté protéique mais au stade, important pour l'application technologique envisagée, de la pureté enzymatique : les 2 préparations purifiées sont exemptes d'activité amylolytique.

Caractères enzymatiques

1. *Activité protéolytique sur la caséine en fonction du pH.*

L'activité des 2 protéases sur la caséine a été étudiée à 30°C dans la zone de pH 5,0-10,0. Les milieux tampons employés étaient les suivants : tampon phosphate 0,1 M (pH 5,0 à 7,5), tampon borate 0,2 M (pH 7,5 à 10,0) (fig. 1). Les résultats montrent que cette activité n'est pas sensiblement influencée par la nature des anions présents dans le milieu réactionnel.

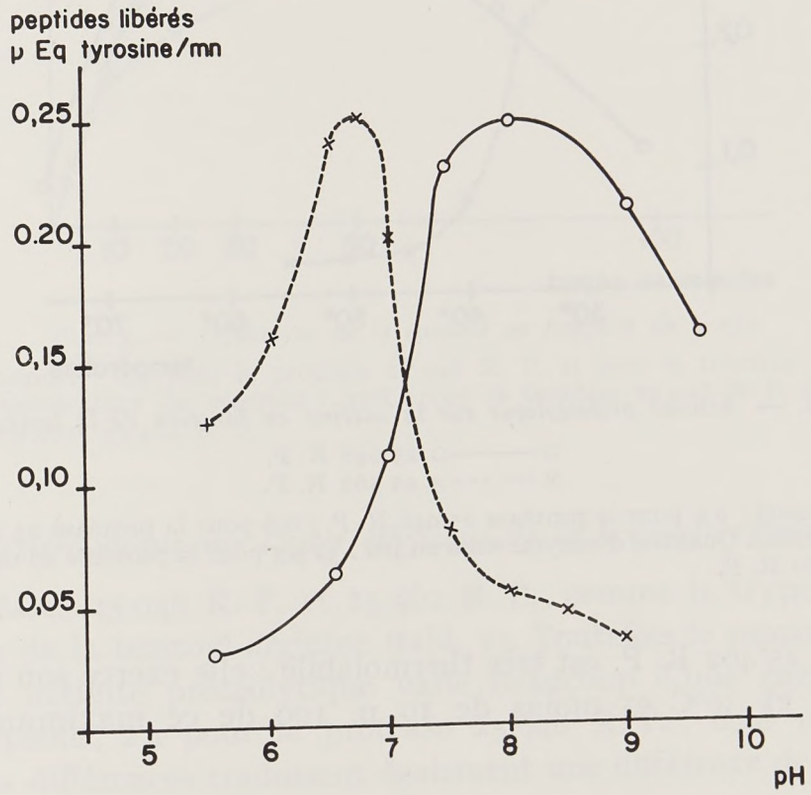


FIG. 1. — *Activité protéolytique sur la caséine en fonction du pH*

○——○ 25 048 R. P.
×------× 25 462 R. P.

Tampon phosphate 0,1 M de pH 5,5 à 7,5 ; tampon borate 0,2 M de pH 8,0 à 9,6. Température de réaction : 37°C pour la protéase 25 048 R. P., 30°C pour la protéase 25 462 R. P. Temps de réaction : 20 mn. Quantité d'enzyme mise en jeu : 32 µg pour la protéase 25 048 R. P., 42 µg pour la protéase 25 462 R. P.

La valeur optimale du pH pour la protéase 25 048 R. P. est voisine de 8,0, l'enzyme gardant une activité supérieure à 50 p. 100 de son activité maximale entre les valeurs 7,0 et 9,6.

Pour la protéase 25 462 R. P., l'optimum se situe vers pH = 6,8 avec une zone favorable plus étroite (plus de 50 p. 100 de l'activité maximale entre les valeurs 5,5 et 7,1).

2. *Activité protéolytique sur la caséine en fonction de la température.*

L'activité des 2 protéases sur la caséine a été étudiée à la valeur optimale du pH, à des températures variant de 25° à 75°C, avec un temps de réaction de 20 minutes (fig. 2).

Pour la protéase 25 048 R. P., la température optimale est voisine de 60°C mais l'activité est encore supérieure à 50 p. 100 de son maximum à 70°C.

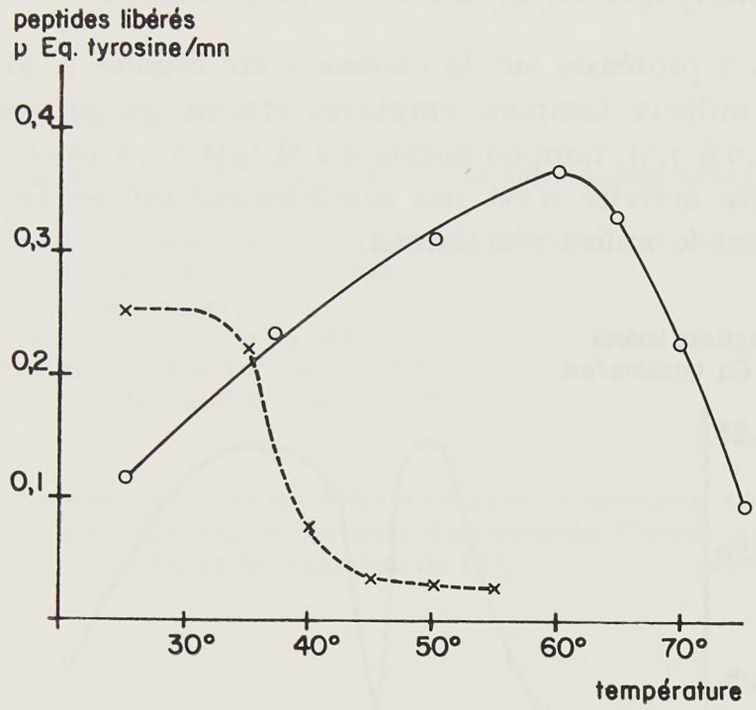


FIG. 2. — *Activité protéolytique sur la caséine en fonction de la température*

o——o 25 048 R. P.
x - - - - - x 25 462 R. P.

pH du milieu réactionnel : 8,0 pour la protéase 25 048 R. P. ; 6,8 pour la protéase 25 462 R. P. Temps de réaction : 20 minutes. Quantité d'enzyme mise en jeu : 32 µg pour la protéase 25 048 R. P., 42 µg pour la protéase 25 462 R. P.

La protéase 25 462 R. P. est très thermolabile : elle exerce son maximum d'activité entre 25° et 30°C et moins de 10 p. 100 de ce maximum au-dessus de 40°C.

3. *Limites de l'hydrolyse de la caséine.*

L'hydrolyse de la caséine à 30°C par des quantités équi-actives de chacune des 2 protéases 25 048 R. P. et 25 462 R. P. et de trypsine cristallisée a été étudiée comparativement en fonction du temps (fig. 3), chaque enzyme travaillant à sa valeur optimale de pH.

Au départ, la cinétique de la réaction est identique pour les 3 enzymes. Assez rapidement, avec la trypsine ou avec la protéase 25 462 R. P., la quantité de peptides acido-solubles libérés atteint un plafond (vers 5 micro-équivalents de tyrosine dans nos conditions de travail) qu'elle ne dépasse pas, même si l'on prolonge très largement la réaction. Avec la protéase 25 048 R. P., en revanche, la réaction se poursuit à la même vitesse pendant un temps nettement plus long et le plafond atteint est 2 fois plus élevé (10 micro-équivalents de tyrosine).

On peut donc penser que les liaisons rompues dans la caséine par cette enzyme sont nettement plus nombreuses que celles qu'hydrolysent la trypsine ou la protéase 25 462 R. P.

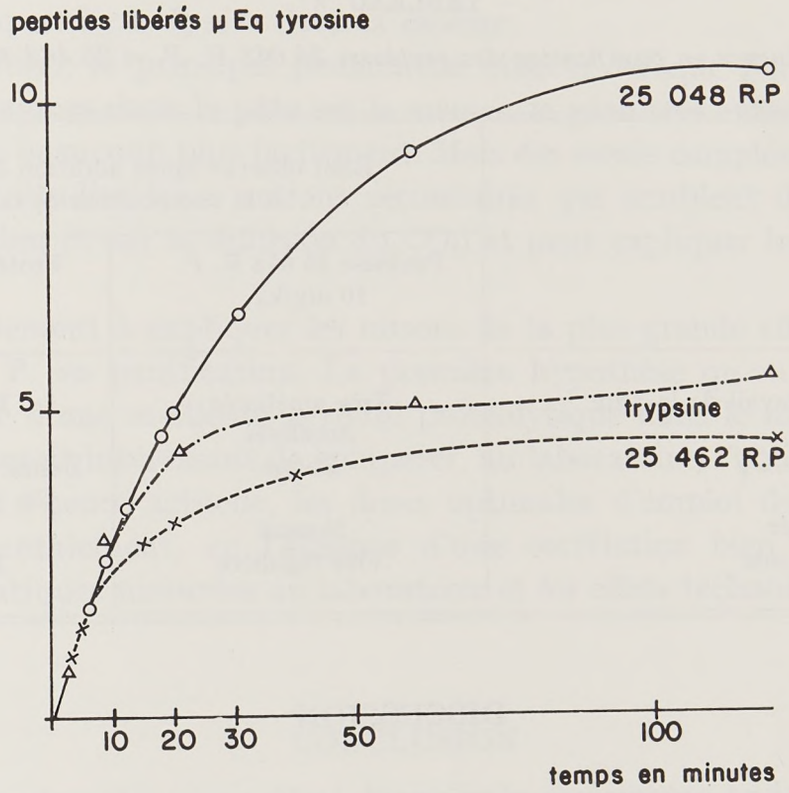


FIG. 3. — *Hydrolyse de la caséine en fonction du temps*

pH du milieu réactionnel : 8,0 pour la protéase 25 048 R. P. et pour la trypsine ; 6,0 pour la protéase 25 462 R. P. Température de réaction : 37°C pour la protéase 25 048 R. P. et pour la trypsine ; 30°C pour la protéase 25 462 R. P.

4. *Activité estérolytique sur l'ester éthylique de la benzoyl-arginine.*

Les 2 protéases 25 048 R. P. et 25 462 R. P., comme la trypsine, hydrolysent l'ester éthylique de la benzoyl-arginine (tabl. 2). Toutefois le rapport entre activité estérolytique et activité protéolytique varie beaucoup d'une enzyme à l'autre : 7,8 pour la trypsine ; 2,1 pour la protéase 25 048 R. P. ; 0,58 pour la protéase 25 462 R. P. Ces différences traduisent également une différence de spécificité entre les 3 enzymes.

Activité en panification

L'étude technologique des 2 protéases a été limitée jusqu'ici à des essais d'orientation sur pain de « type français ». Ces essais ont permis d'abord de fixer leur dose optimale d'emploi : 10 mg/kg pour la protéase 25 048 R. P. ; 5 mg/kg pour la protéase 25 462 R. P. Nous avons pu confirmer en effet que si l'activité protéolytique introduite dans la pâte est trop intense, le réseau protéique perd sa structure, la pâte devient collante et se dégrade rapidement.

Les autres observations faites avec les 2 enzymes utilisées à leur dose optimale sont résumées dans le tableau 3. Avec les 2 protéases, on note une très grande facilité de travail de la pâte qui est très extensible et peu élastique et une plus grande

régularité de la mie. La protéase 25 048 R. P. accélère de plus la fermentation. La protéase 25 462 R. P. donne des pâtes qui supportent mal un allongement du temps d'apprêt (on a alors une importante diffusion du CO_2).

TABLEAU 3

Influence en panification des protéases 25 048 R. P. et 25 462 R. P.

	Effet observé après addition de protéase à la composition de la pâte	
	Protéase 25 048 R. P. 10 mg/kg	Protéase 25 462 R. P. 5 mg/kg
Facilité du travail de la pâte	Très améliorée	Très améliorée
Fermentation	Accélérée	Normale
Rétention du CO_2	Bonne	Bonne si l'on ne prolonge pas la durée d'apprêt
Volume du pain	Normal	Normal
Texture de la mie	Plus régulière	Plus régulière

DISCUSSION

Sur 2 096 micro-organismes récemment isolés, 7 souches de *Streptomyces* ont été sélectionnées en raison de leur activité protéolytique. Après isolement des protéases correspondantes, nous avons pu constater qu'elles appartenaient à 2 types différents dont les représentants ont été purifiés et étudiés de façon plus approfondie :

— 25 048 R. P., protéase de *Streptomyces nebulosus* NRRL 3 864 ;

— 25 462 R. P., protéase de *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 3 999.

Le tableau 4 où sont rassemblées les principales propriétés des 2 protéases met bien en évidence les différences qui les séparent. On peut les caractériser ainsi :

TABLEAU 4

Caractéristiques comparées des 2 protéases

	Protéase 25 048 R. P.	Protéase 25 462 R. P.
pH optimal	8,0	6,7
Température optimale (°C)	60	25
Activité sur caséine en U/g	3 800	2 800
Activité sur BAEE en U/g [1]	8 000	1 600
Dose optimale en panification en mg/kg	10	5

[1] BAEE : ester éthylique de la benzoyl-arginine.

25 048 R. P. : protéase active en milieu légèrement alcalin, thermostable, hydrolysant dans la caséine plus de liaisons peptidiques que la trypsine ;

25 462 R. P. : protéase active dans une zone étroite de pH en milieu légèrement acide, thermolabile, comparable à la trypsine par le nombre de liaisons peptidiques hydrolysées dans la caséine.

En panification, le principal phénomène observé lorsque l'on ajoute l'une ou l'autre de ces enzymes dans la pâte est le même : la pâte très extensible et peu élastique se travaille beaucoup plus facilement. Mais des essais complémentaires seraient nécessaires pour étudier leurs actions secondaires qui semblent différentes (action sur la fermentation et sur la diffusion du CO_2) et pour expliquer les raisons de cette différence.

Il reste également à expliquer les raisons de la plus grande efficacité de la protéase 25 462 R. P. en panification. La première hypothèse qu'on peut formuler à ce sujet est celle d'une meilleure activité protéolytique dans le milieu acide qu'est la pâte. Mais il serait intéressant de comparer, au laboratoire, l'action des 2 enzymes sur le gluten. A l'heure actuelle, les doses optimales d'emploi doivent être déterminées expérimentalement, en l'absence d'une corrélation bien établie entre les activités enzymatiques mesurées au laboratoire et les effets technologiques observés.

CONCLUSION

Nous avons pu isoler 2 protéases originales de *Streptomyces* et les amener à un état de purification suffisant pour que l'interprétation des essais technologiques soit relativement facile : les préparations obtenues sont totalement exemptes d'activité sur l'amidon.

Une étude au laboratoire, réalisée principalement avec la caséine comme substrat, a permis de préciser les caractéristiques des 2 protéases qui diffèrent entre elles par leur comportement en fonction du pH et de la température et par leur spécificité. Des essais préliminaires en panification ont montré que l'introduction de l'une ou de l'autre de ces enzymes dans une pâte à pain en facilitait très nettement le travail.

Cette étude pourrait utilement être complétée par l'examen, au laboratoire, de l'action des 2 protéases sur le gluten et par un élargissement des essais en panification et en biscuiterie, pour préciser leur action technologique et la comparer à celle des protéases classiques d'*Aspergillus oryzae* ou de *Bacillus subtilis*. Il serait très intéressant, en effet, de pouvoir établir une corrélation entre l'activité enzymatique mesurée au laboratoire et l'activité observée au cours des essais technologiques.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Mme Mancy, MM. Florent et Lunel (Laboratoires de Recherches de Vitry-sur-Seine de la S. U. C. R. P.) et MM. Achard et David (Laboratoires de Recherches de Saint-Fons de la S. U. C. R. P.) pour l'aide qu'ils nous ont apportée respectivement pour la préparation des enzymes et pour les essais technologiques.

SUMMARY

ISOLATION, PURIFICATION AND PROPERTIES OF 2 PROTEASES FROM *STREPTOMYCES*

Two native proteases were isolated from *Streptomyces* : 25 048 R. P. and 25 462 R. P. These strains have not the same behaviour with temperature and pH : activity of the first is maximal at 65°C and pH 8.0, activity of the second is maximal at 30°C and pH 6.8. With casein as substrate, 25 048 R. P. protease hydrolyses more many peptidic bonds than 25 462 R. P. protease. Technologic tests showed that the two enzymes help to dough working.

ZUSAMMENFASSUNG

ISOLIERUNG, REINIGUNG UND EIGENSCHAFTEN VON ZWEI *STREPTOMYCES*-PROTEASEN

Aus zwei verschiedenen *Streptomyces*-Kulturen 25 048 R. P. und 25 462 R. P. wurden zwei spezielle Proteasen isoliert. Sie unterscheiden sich durch ihr unterschiedliches Verhalten bezüglich Temperatur und pH. Die maximale Aktivität der ersteren liegt bei einer Temperatur von 65°C und einem pH-Wert von 8,0 und bei der anderen bei 30°C und einem pH von 6,8. Bei Verwendung eines Caseinsubstrates hydrolysiert die Protease 25 048 R. P. mehr Peptidbindungen als die Protease 25 462 R. P. Technologische Orientierungsversuche haben gezeigt, dass beide Enzyme die Teigbereitung wesentlich erleichtern Können. Diskussion.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bernfeld P., 1955. In Colowick S. P., Kaplan N. O., *Methods in enzymology*, vol. 1, 149-150. Academic Press, New York.

Heinicke R. M., Larson C., Levand O., McCarter M., 1967. The study of the use of the autoanalyzer on proteases. *Technicon symposia*, **1**, 207-212.

Hites B. D., Sandstedt R., Schaumburg L., 1951. Study of proteolytic activity in wheat flour doughs and suspensions. II. A papain inhibitor in flour. *Cereal Chem.*, **28**, 1-18.

Learmonth E. M., Wood J. C., 1963. A trypsin inhibitor in wheat flour. *Cereal Chem.*, **40**, 61-65.

Petit L., Audidier Y., 1967. Action des protéinases dans les industries de cuisson. *Ann. Nutr. Alim.*, **21**, B 347-360.

Pomeranz Y., Rubenthaler G. L., Finney K. E., 1966. Evaluation of the effects of proteolytic enzymes on bread flour properties. *Food Technol.*, **20**, 95-98.

Reed G., 1966. *Enzymes in food processing*, 238-249. Academic Press, New York.

Rick W., 1963 *a*. In Bergmeyer H. U., *Methods of enzymatic analysis*, 811-814. Academic Press, New York.

Rick W., 1963 *b*. *Ibid.*, 815-818.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 215-221.

MÉTHODE DE DOSAGE DIFFÉRENTIEL D'ALPHA-AMYLASES BACTÉRIENNE ET FONGIQUE EN SOLUTION

M. BERGER et P. GRANDVOINNET
avec la collaboration technique de Jacqueline SENNEDOT

Grands Moulins de Pantin,
62, rue du Louvre,
75002 Paris

RÉSUMÉ

Une méthode rapide de dosage différentiel des alpha-amylases bactérienne et fongique en solution est proposée. Elle repose sur la différence de thermosensibilité de ces deux enzymes. La différenciation thermique ainsi que les mesures sont effectuées à l'aide de l'appareil de Hagberg. La précision des résultats obtenus repose sur l'identification des souches dont sont issues les enzymes.

INTRODUCTION

La thermostabilité des alpha-amylases bactériennes et la thermolabilité des alpha-amylases fongiques permettent d'expliquer en partie la différence d'action que l'on observe entre ces deux types d'enzymes, en utilisant l'appareil de Hagberg. On peut donc penser qu'en faisant subir un traitement thermique approprié à une solution de leur mélange il sera possible de détruire complètement l'enzyme la plus thermosensible en conservant la presque totalité de l'alpha-amylase thermorésistante. Un étalonnage préalable permet de déterminer l'activité totale du mélange avant dénaturation thermique, puis la quantité d'alpha-amylase thermostable persistant après action de la chaleur. Il suffit ensuite d'appliquer la loi des mélanges que nous avons décrite (BERGER et GRANDVOINNET, sous presse) pour déterminer la quantité de l'alpha-amylase thermolabile présente dans le mélange.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-135-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

En 1961, Fleming, Miller et Johnson ont exposé une méthode utilisant d'une part l'amylographe de Brabender pour dénaturer les enzymes et d'autre part la méthode colorimétrique de Hagberg (1961) pour déterminer les quantités respectives d'alpha-amylases bactérienne, fongique et de malt présentes dans un mélange. Le principe de leur méthode est simple ; il repose sur la différence de thermostabilité entre ces trois enzymes. En effet, les pourcentages d'enzymes persistant à trois températures (65, 70 et 80°C) sont donnés dans le tableau 1 (d'après Fleming, Miller et Johnson).

TABLEAU I

Température (°C)	Enzymes		
	Fongique	Malt	Bactérienne
65	100	100	100
70	54	100	100
80	5	58	100

En dosant donc l'activité alpha-amylasique persistant à ces trois températures et en les portant dans un système de trois équations à trois inconnues, ces auteurs ont montré qu'il est possible de calculer les quantités initialement présentes dans le mélange.

Bien qu'assez séduisante, cette méthode est longue et matériellement lourde à utiliser. Nous avons donc repris ce problème en utilisant l'appareil de Hagberg à la fois pour dénaturer thermiquement les enzymes et pour mesurer leur activité.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

1. — *Matériel*

— amidon de blé des Éts Roquette ;

— alpha-amylases de la Société Rapidase :

- alpha-amylase fongique réf. F 25 n° 353 (*Aspergillus oryzae* titrant 5 385 unités SKB/g (méthode ICC n° 108 1962) ;
- alpha-amylase bactérienne réf. B 25 n° 109 (*Bacillus subtilis* titrant 3 220 unités SKB/g (méthode ICC n° 108 1962).

— Appareil de Hagberg.

2. — *Méthode*

Cinquante ml de la solution enzymatique sont versés dans un tube de Hagberg. Au temps $t = 0$, on plonge ce tube dans le bain-marie bouillant de l'appareil et on agite la solution avec le pénétromètre à la cadence de 2 va-et-vient par seconde. A $t = 1$ mn 30 secondes, le tube est retiré du bain-marie et mis à refroidir dans un bécher rempli d'eau à 15°C environ. L'agitation est maintenue à la même cadence pendant 1 mn 30 secondes. La solution est alors suffisamment refroidie pour ne pas risquer de dénaturation supplémentaire. On prélève ensuite 25 ml de cette solution pour effectuer un test de Hagberg dans les conditions décrites par la norme ICC 107.

L'activité des alpha-amylases a été déterminée sur 6 grammes d'amidon (matière telle quelle) et 25 ml de préparation enzymatique en milieu chlorure de calcium à 2 p. 1 000.

RÉSULTATS OBTENUS

A. — *Étalonnage de l'activité de ces enzymes*

1. *Action séparée de chaque enzyme.*

Nous ne portons ici que la forme générale des équations de régression $NL = f$ (SKB), la valeur exacte des différents coefficients n'ayant qu'un intérêt très relatif dans le cadre de cet exposé.

Soient NL_0 : le nombre de liquéfaction du substrat sans addition d'alpha-amylase ;

NL : le nombre de liquéfaction du substrat après addition d'alpha-amylase ;

k : le coefficient d'activité de l'enzyme testée ;

et s : le nombre d'unités SKB ajoutées par gramme de farine.

a) Activité de l'alpha-amylase bactérienne :

$$NL = NL_0 + k_1 \cdot s \qquad (1)$$

Dans le cas de cette enzyme, on est amené très souvent à décomposer la courbe $NL = f$ (SKB) en 2 régressions :

— pour de faibles quantités d'enzyme :

$$NL = NL_0 + k'' \cdot \log s$$

— pour des quantités supérieures :

$$NL = NL' + k' \cdot s$$

Ces deux types d'équations ne se justifient que dans le cas d'utilisation d'un substrat tel que l'amidon pur. Dans le cas d'une farine simplement hypodiastasique, l'équation (1) est pleinement satisfaisante.

b) Activité de l'alpha-amylase fongique :

$$NL = NL_0 + k_2 \cdot s$$

2. *Loi des mélanges de ces 2 enzymes.*

Ainsi que nous l'avions déjà montré, le nombre de liquéfaction d'un mélange répond à l'équation générale :

$$NL \text{ d'un mélange} = NL_0 + \Sigma\,(k_1 \cdot s + k_2 \cdot s)$$

La corrélation NL calculés f (NL expérimentaux) n'a pas un coefficient angulaire égal à l'unité, ni une ordonnée à l'origine nulle

$$NL_{\text{calculés}} = a \cdot NL_{\text{expérimentaux}} + \varepsilon \qquad (3)$$

Le coefficient angulaire (a) ainsi que l'ordonnée à l'origine (ε) ne sont pas statistiquement différents : (a) de 1, (ε) de 0.

B. — *Cinétiques de dénaturation thermique*

La détermination de la durée de dénaturation thermique des préparations enzymatiques permettant d'obtenir une différenciation optimale a été réalisée de la manière suivante.

Les essais ont été effectués sur trois concentrations d'alpha-amylases permettant d'obtenir des indices de chute avant dénaturation de 210, 160 et 110 secondes, les temps de dénaturation thermique ont varié de 0 à 300 secondes.

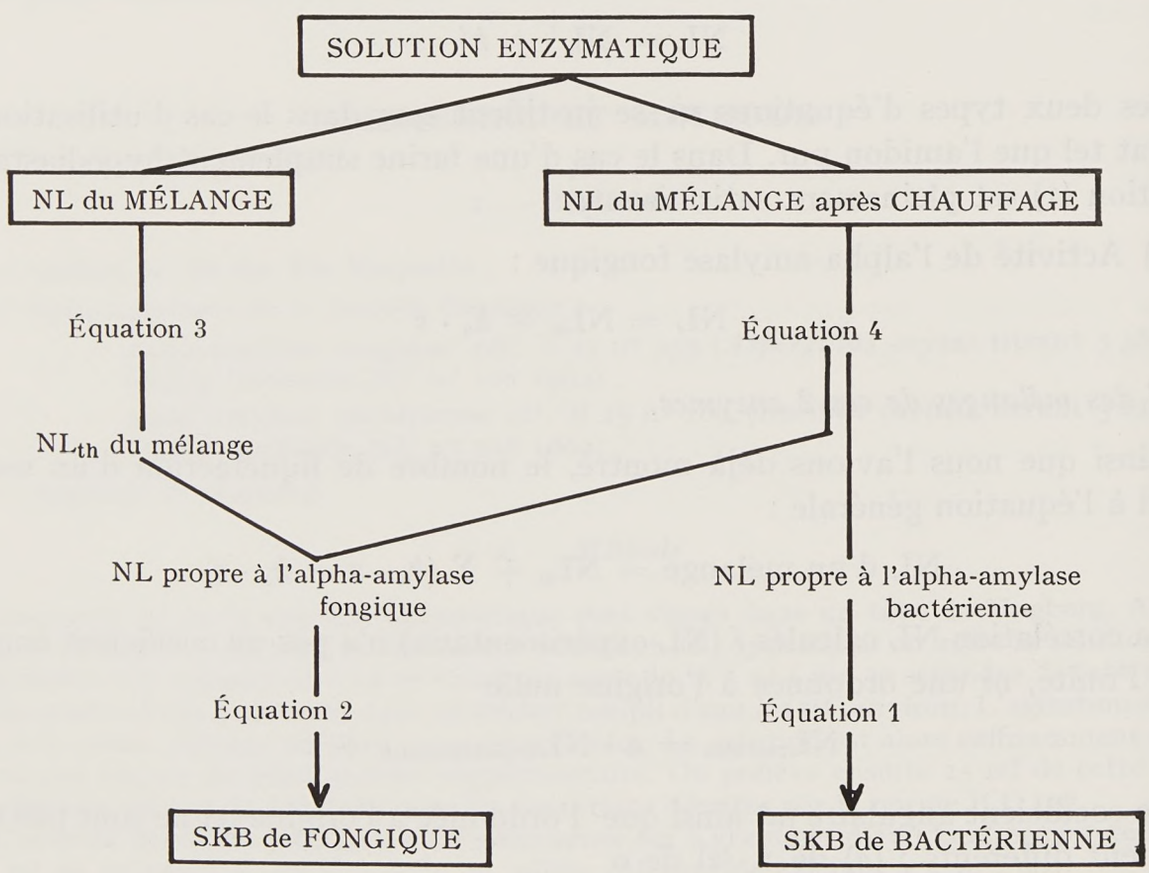
Après avoir transformé les nombres de liquéfaction obtenus à divers temps de dénaturation en pour 100 des unités SKB mises dans la solution initiale à l'aide des équations d'étalonnage (1 et 2), nous avons représenté sur la figure 1 les cinétiques moyennes de dégradation de ces deux enzymes. Les pourcentages d'enzyme dénaturée varient suivant les concentrations initiales, cependant les 2 courbes sont suffisamment distinctes pour que l'action de ce paramètre soit considérée comme négligeable.

Les dérivées de ces courbes multipliées par les coefficients d'action (pente des droites 1 et 2) de chacune de ces alpha-amylases (3,475 pour l'alpha-amylase fongique et 19,79 pour l'alpha-amylase bactérienne) ont été portées sur la figure 2. Le maximum de différenciation se situe entre 90 et 110 secondes. Pour des raisons pratiques, nous avons choisi 90 secondes comme temps optimum de dénaturation.

La corrélation entre les nombres de liquéfaction obtenus avant et après dénaturation par chauffage de quantités différentes d'amylase bactérienne est la suivante (34 valeurs) :

$$\frac{10^3}{NL} = \frac{968}{NL \text{ après chauffage}} - 0{,}709 \qquad r = 0{,}937^{**} \qquad (4)$$

TABLEAU 2



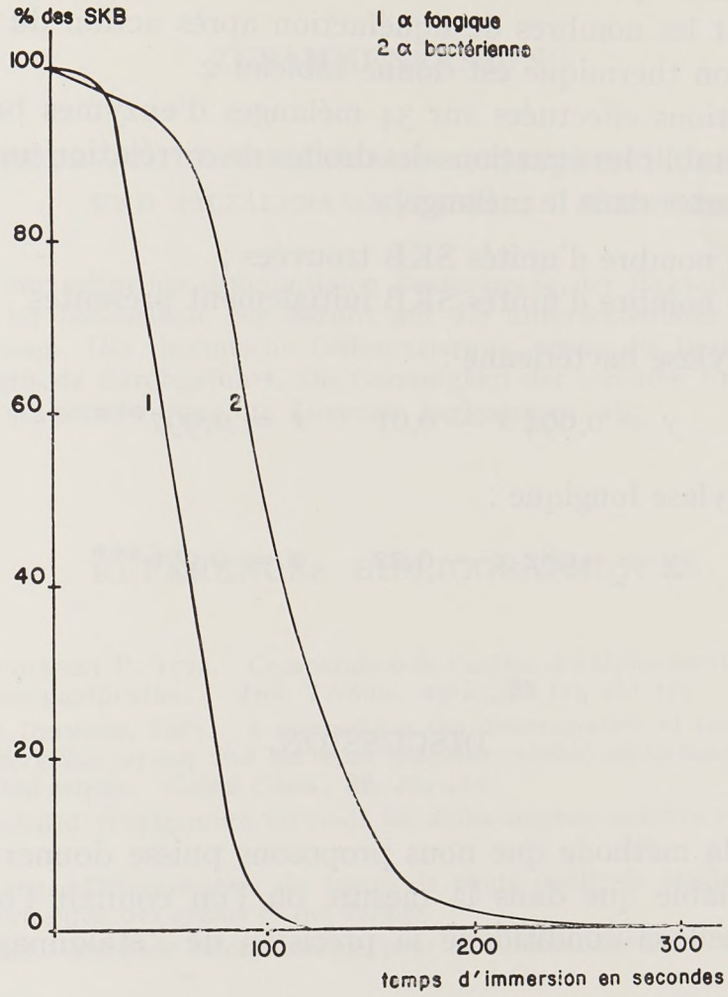


FIG. 1. — *Cinétiques moyennes de dénaturation des alpha-amylases bactérienne et fongique*

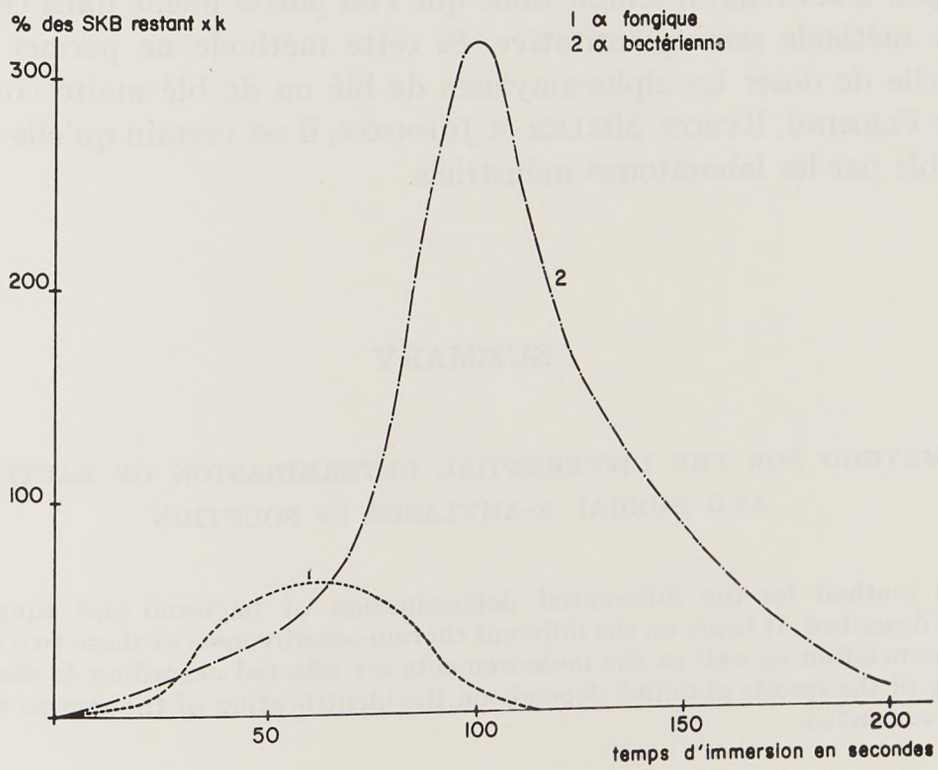


FIG. 2. — *Représentation des dérivées de la fig. 1 multipliées par les coefficients d'activité des enzymes*

Le mode de calcul permettant de déterminer les quantités de chaque alpha-amylase connaissant les nombres de liquéfaction après action du mélange tel quel, et après dénaturation thermique est donné tableau 2.

Des déterminations effectuées sur 34 mélanges d'enzymes bactérienne et fongique ont permis d'établir les équations des droites de corrélation unités SKB trouvées f (unités SKB présentes dans le mélange).

Soient y = le nombre d'unités SKB trouvées ;
x = le nombre d'unités SKB initialement présentes.

— Pour l'alpha-amylase bactérienne :

$$y = 0{,}994\ x - 0{,}01 \qquad r = 0{,}997^{***}$$

— Pour l'alpha-amylase fongique :

$$y = 0{,}982\ x - 0{,}22 \qquad r = 0{,}976^{***}$$

DISCUSSION

Il semble que la méthode que nous proposons puisse donner satisfaction. Elle n'est cependant valable que dans la mesure où l'on connaît l'origine des alpha-amylases puisque celle-ci conditionne la précision de l'étalonnage, base de notre calcul.

Quelle que soit l'espèce ou même le genre dont est issue une alpha-amylase, une enzyme fongique sera toujours beaucoup plus thermolabile qu'une alpha-amylase bactérienne. Les micro-organismes choisis par les producteurs d'enzymes industriels sont assez peu nombreux, il semble donc que l'on puisse même dans ce cas là bénéficier d'une méthode semi-quantitative. Si cette méthode ne permet pas dans sa forme actuelle de doser les alpha-amylases de blé ou de blé malté comme dans la méthode de Fleming, Byron, Miller et Johnson, il est certain qu'elle est beaucoup plus maniable par les laboratoires industriels.

SUMMARY

A METHOD FOR THE DIFFERENTIAL DETERMINATION OF BACTERIAL AND FUNGAL α-AMYLASES IN SOLUTION

A rapid method for the differential determination of bacterial and fungal α-amylases in solution is described. It bears on the different thermo-sensitiveness of these two enzymes — the thermic differenciation as well as the measurements are effected according to the Hagberg test. The accuracy of the results obtained depends on the identification of the strains from which the enzymes are extracted.

ZUSAMMENFASSUNG

EINE METHODE ZUR DIFFERENTIALEN BESTIMMUNG DER BAKTERIEN- UND PILZALPHA-AMYLASEN IN ZÖSUNGEN

Eine Methode zur schnellen differentialen Bestimmung der Bakterien- und Pilzalphaamylasen in Zösungen ist beschriben. Sie beruht auf die unterschiedliche Wärmeempfindlichkeit dieser beiden Enzymen. Die thermische Differenzierung, sowie die Bestimmungen werden mit Hilfe der Hagbermethode durchgeführt. Die Genanigkeit der erzielten Ergebnisse hängt von der Identifizierung der stämme woraus die Znzymen herkommen, ab.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Berger M., Grandvoinnet P., 1974. Comparaison de l'action des alpha-amylases bactérienne, fongique et du malt d'orge en panification. *Ann. Technol. agric.*, **23** (2), 161-174.

Fleming, Miller et Johnson, 1961. A method for the determination of relative amounts of malted-wheat, fungal (*Aspergillus oryzae*) and bacterial (*Bacillus subtilis*) alpha-amylase in mixtures, and its application to malted wheat. *Cereal Chem.*, **38**, 479-485.

Hagberg, 1961. Modified Wohlgemuth methods for alpha-amylase activity of wheat and rye. *Cereal Chem.*, **38**, 241-250.

I. C. C. Standard 107. Détermination du temps de chute (méthode Hagberg-Perten) pour mesurer l'activité alpha-amylasique des grains et des farines.

I. C. C. Standard 108. Méthode colorimétrique pour la détermination de l'activité alpha-amylasique.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 223-231.

ÉTUDE CRITIQUE DES MÉTHODES CHIMIQUES DE DOSAGE DES ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUES

L. PETIT

avec la collaboration technique de Mme E. Fittes et Mlle J. Ooghe

Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert 91300 Massy

INTRODUCTION

Lorsque cette action concertée a été lancée, il avait été prévu d'organiser des circuits d'analyse en matière d'appréciation des pouvoirs enzymatiques des différentes préparations, en particulier des activités protéolytiques. Il existait une méthode officielle, la méthode Ayre-Anderson (*Cereal Laboratory Methods*, 1962), initialement prévue pour le dosage des activités protéolytiques des farines et des malts et dont l'emploi avait été étendu, aux États-Unis, à l'appréciation des activités protéolytiques des préparations enzymatiques utilisées dans les industries de cuisson, donc particulièrement de préparations d'origine fongique.

Les résultats des premiers circuits ont été surprenants, les activités extrêmes chiffrées par chacun des participants sur une même source d'enzyme variant de 1 à 50. Dans ces conditions, le dosage de l'activité protéolytique a paru poser des problèmes différents de ceux d'une simple prise en main et a dû faire l'objet d'un examen plus précis dans le but de découvrir les causes des discordances entre laboratoires. Au cours de cette exploration, d'autres faits sont apparus, dont l'examen nous a finalement conduit à des conclusions tout autres que celles que nous envisagions au départ, en particulier à mettre en doute la signification de cette méthode de dosage (et même des autres méthodes semblables).

Je voudrais donc rappeler d'abord ce qu'est cette méthode Ayre-Anderson, puis les principales observations qui ont pu être faites tant en ce qui concerne ses modalités d'exécution que la signification vis-à-vis du gluten de blé des activités qu'elle permet de repérer.

LA MÉTHODE AYRE-ANDERSON

Décrite pour évaluer l'activité protéolytique des farines et des malts, elle consiste à faire agir ces produits sur un substrat étranger qui est la bactohémoglobine de la marque Difco (BHG).

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-269-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

Cette bactohémoglobine est mise en solution dans un tampon acétate 0,1 M de pH 4,7. Après addition de la source enzymatique, on fait incuber à 40°C pendant 5 h. Après ce temps, on bloque l'activité protéolytique et on précipite les protéines non digérées par défécation à l'acide trichloracétique, à une concentration de 6 p. 100. Après filtration ou centrifugation, on dose l'azote soluble, qui comprend l'azote solubilisé par protéolyse (par définition) et aussi l'azote naturellement soluble dans ces conditions éventuellement présent dans la farine et dans le substrat. On dose cette sorte d'azote dans une expérience « à blanc » dans laquelle la défécation est effectuée 15 minutes après mélange de la farine et de la solution de bactohémoglobine ; par soustraction des deux valeurs, on obtient donc la part de l'azote correspondant à la seule protéolyse.

La relation entre la quantité d'enzyme mise en jeu, c'est-à-dire le poids d'échantillon, et la quantité d'azote ainsi dosée n'est pas linéaire. Par contre, si on élève à la puissance 3/2 cette quantité d'azote alors, dans certaines limites de concentration en enzyme, il y a proportionnalité entre les deux termes :

$$(N)^{3/2} = K(E)$$

C'est cette relation qui sert à définir les « unités hémoglobine » (Hemoglobin unit = HU).

Telle qu'elle est, cette méthode n'est sans doute pas exempte de critiques, en particulier en ce qui concerne la sélection opérée dans les formes d'azote dosées ; mais, appliquée au matériel pour lequel elle a été mise au point et préconisée, elle donne de « bons résultats », en ce sens que des calculs du nombre de HU faits à partir de protéolyses mettant en jeu des quantités variables d'un même matériel enzymatique permettent d'aboutir à des valeurs concordantes aux inévitables erreurs près, soit 5-10 p. 100.

LA MÉTHODE AYRE-ANDERSON APPLIQUÉE AUX ENZYMES MICROBIENNES

Or, utilisée dans une circuit d'analyses portant sur deux préparations microbiennes, l'une bactérienne l'autre fongique, elle a donné lieu à des estimations parfaitement discordantes dont nous avons tenté de rechercher les causes.

Nous ne nous étendrons pas sur le détail de ce travail qui a été conduit avec une préparation bactérienne de la Société Rapidase et au cours duquel ont été examinés les différents paramètres dont les variations auraient pu justifier de fluctuations des résultats : précision des prises, état de dispersion du substrat, pH de la solution, concentration du défécant, etc. Pour un même opérateur, aucune des variations admissibles ne conduit à des écarts supérieurs à quelques p. 100.

Cherchant alors si la présence d'activateurs ou d'inhibiteurs dans l'eau utilisée par les divers participants ne pouvaient être incriminée, nous avons constaté que les ions Ca^{++} (et aussi Mg^{++}, Ba^{++}) influençaient nettement l'activité protéolytique de notre préparation. A concentration en enzyme constante — égale à 12×10^{-2} mg/ml dans ce cas particulier — on observe la variation d'azote soluble formé qui est illustrée par la figure 1, où la concentration en azote soluble du milieu de protéolyse est donnée en fonction du logarithme de la concentration des ions Ca^{++}. Il existe une concentration minimale au-dessous de laquelle les ions Ca^{++} sont manifestement sans effet, mais au-dessus de laquelle par contre ils agissent en activateurs.

Ceci étant acquis, si on étudie la protéolyse en faisant varier à la fois la concentration en Ca^{++} et la concentration en enzymes, on obtient des réseaux de graphes tels que ceux rapportés sur la figure 2.

On voit que l'on a affaire à des variations linéaires de N en fonction de E et que la pente et l'abscisse à l'origine des droites représentatives sont des paramètres qui sont eux-mêmes sous la dépendance de la concentration en calcium réalisée.

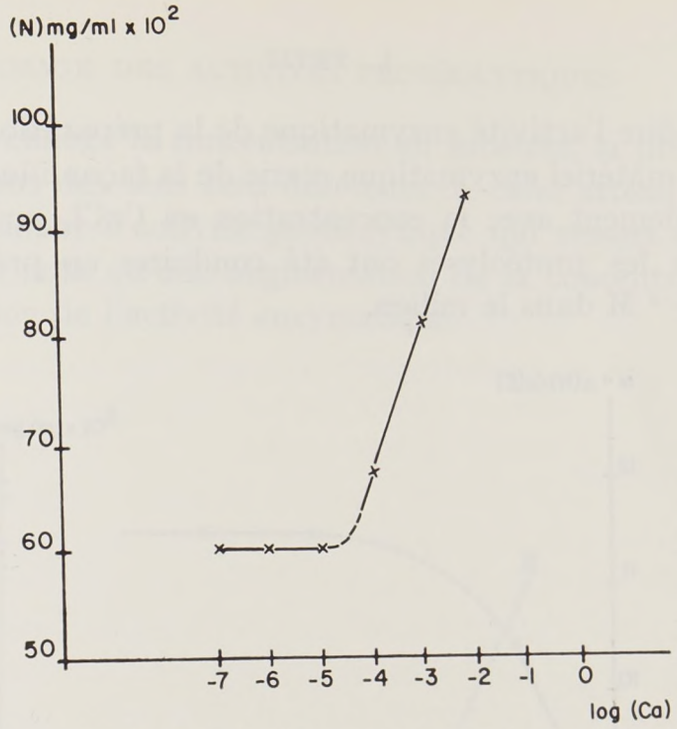


FIG. 1. — *Ration entre la concentration en calcium et la concentration en N soluble* (Préparation ATP 8/1 de Rapidase ; substrat BHG)

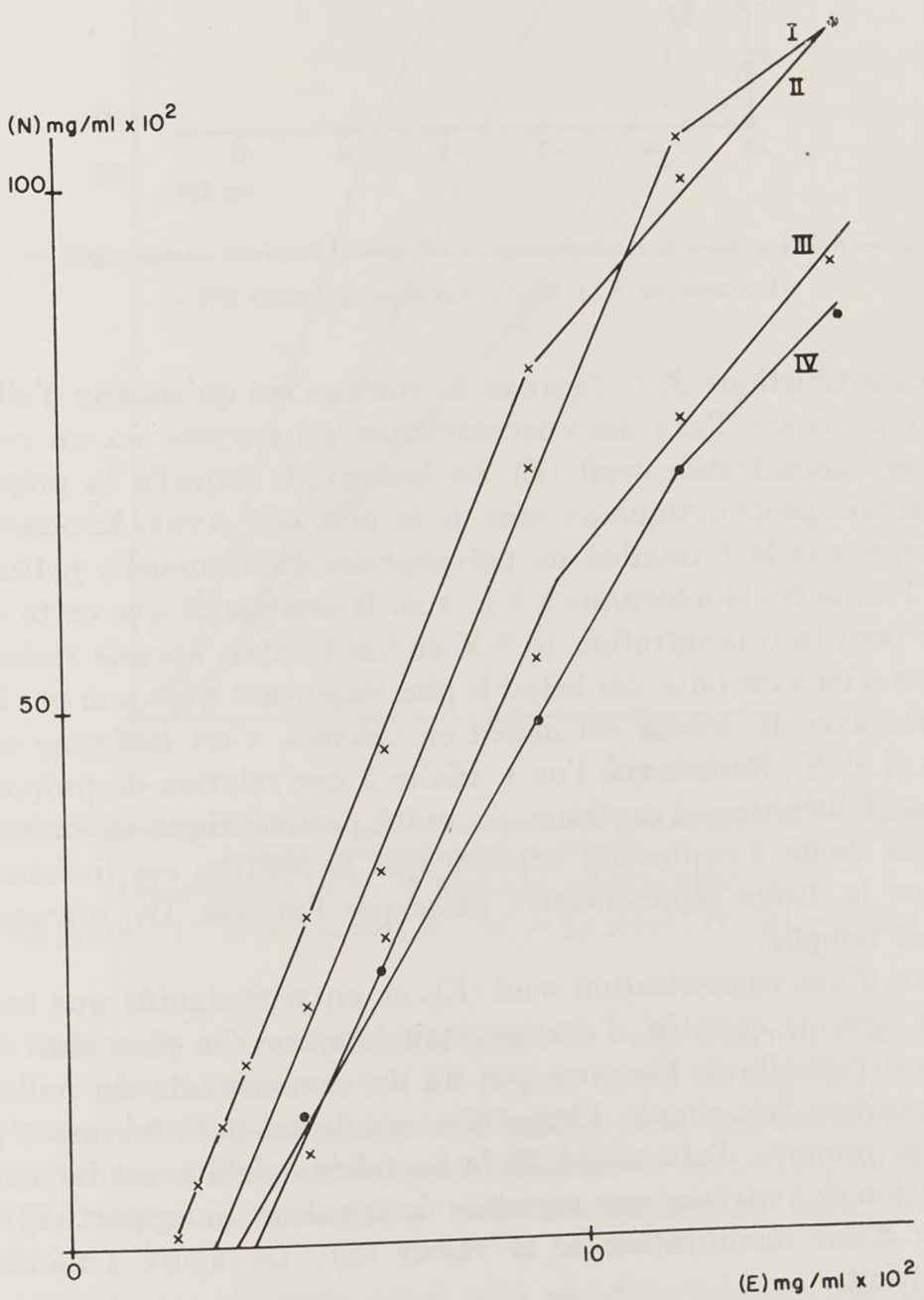


FIG. 2. — *Relation entre la concentration en enzyme et la concentration en N soluble, à diverses concentrations en calcium* (Préparation ATP 8/1 de Rapidase ; substrat BHG)
I : [Ca] = 10^{-1} ; II : [Ca] = 10^{-2} ; III : [Ca] = 10^{-4} ; IV : [Ca] = 10^{-5} M

La pente α, c'est-à-dire l'activité enzymatique de la préparation exprimée en mg de N libéré par mg de matériel enzymatique, varie de la façon illustrée par la figure 3 : elle augmente rapidement avec la concentration en $CaCl_2$ puis reste constante. A partir de là, toutes les protéolyses ont été conduites en présence de $CaCl_2$ à la concentration de 10^{-2} M dans le milieu.

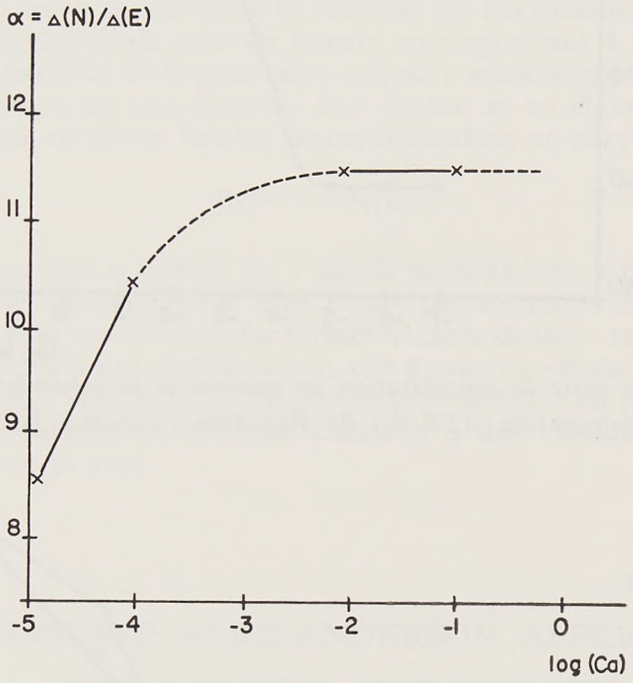


FIG. 3. — *Relation entre la concentration en calcium et l'activité protéolytique* $= \frac{(N)}{(E)}$
(Préparation ATP 8/1 de Rapidase, substrat BHG)

L'autre caractéristique de ce faisceau de courbes est qu'aucune d'elles ne passe par l'origine mais coupe l'axe des concentrations en enzyme en un certain point définissant une concentration-seuil (E) au-dessous de laquelle la préparation est dépourvue d'action protéolytique au sens de la méthode AYRE-ANDERSON, c'est-à-dire ne provoque pas la formation de polypeptides suffisamment petits pour être solubles dans l'acide trichloracétique à 6 p. 100. Il semblerait que cette valeur seuil soit minimale pour la concentration 10^{-2} M en $CaCl_2$. Mais aucune recherche systématique précise n'en a été faite, car le fait le plus important c'est non pas la variation de α ou de E_s avec la teneur du milieu en calcium, c'est la forme même de la relatien entre E et N ; du fait que l'on a affaire à une relation de proportionnalité, il est absolument illégitime d'exprimer l'activité protéolytique en unités hémoglobine, puisque ce mode d'expression suppose que la relation est linéaire entre (E) et $(N)^{3/2}$ et que la droite représentative passe par l'origine. Or, aucune des deux conditions n'est remplie.

L'existence d'une concentration seuil $(E)_s$ en enzyme signifie que tout se passe comme si une certaine quantité d'enzyme était bloquée. On pose ainsi la question d'une inhibition partielle de l'enzyme par un des constituants du milieu ; celui-ci étant de composition très simple, l'hypothèse que le substrat lui-même puisse être mis en cause se présente d'elle-même. Si la bactohémoglobine est bien responsable d'une inactivation de l'enzyme, une variation de la valeur du rapport (E)/(S) devrait s'accompagner d'une modification de la valeur $(E)_s$. La figure 4 montre ce qu'il en est dans les faits.

On voit que si on change la concentration en substrat, la protéolyse est sensiblement modifiée et dans des sens bien différents de celui attendu. Le fait le plus frappant est le changement d'activité protéolytique qui ressort des variations de pente $\alpha = (N)/(E)$; on note qu'une augmentation de la concentration en substrat provoque une diminution de l'activité enzymatique.

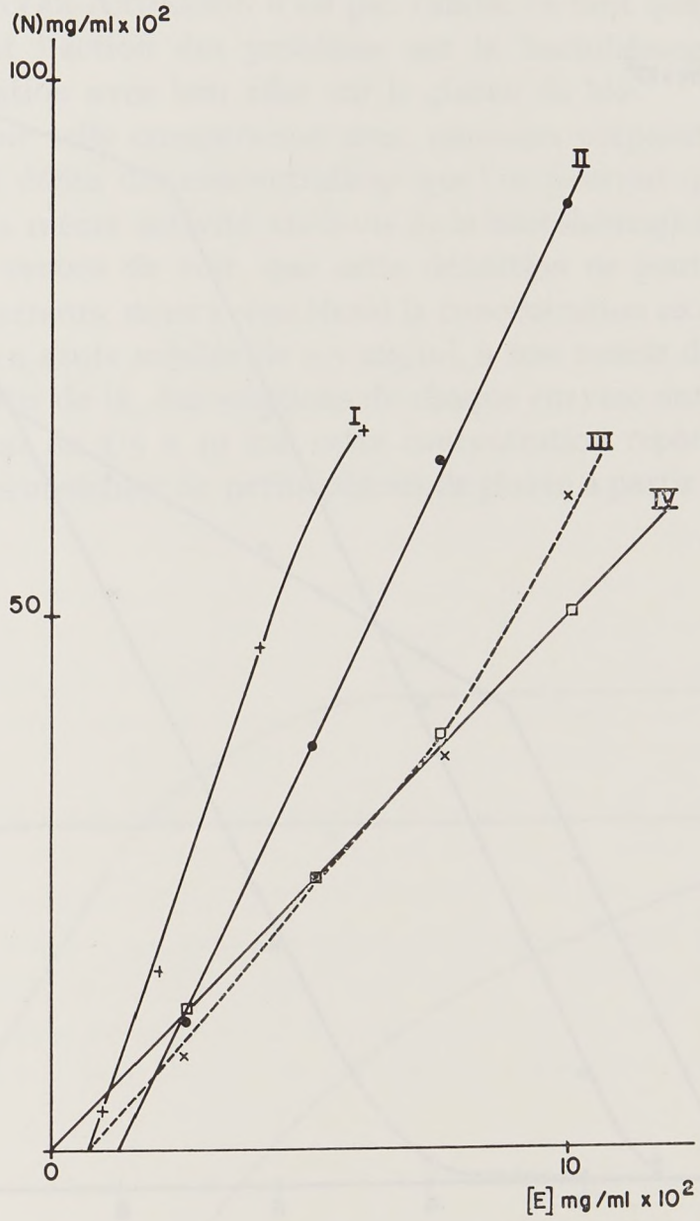


FIG. 4. — *Relation entre la concentration en enzyme et la concentration en N soluble, à diverses concentrations en substrat*
(Préparation ATP 8/1 de Rapidase ; substrat BHG)
:[S] = 2,5 p. 100 ; II : [S] = 5 p. 100 ; III ; [S] = 7,5 p. 100 ; IV : [S] = 10 p. 1 000

Quant à la valeur de la concentration seuil $(E)_s$, elle s'accroît d'abord lorsque la concentration en substrat passe de 2,5 à 5 p. 100, ce qui correspond à notre hypothèse de départ, mais décroît ensuite pour s'annuler à la concentration maximale utilisée : pour une concentration en bactohémoglobine de 10 p. 100, on obtient une droite passant par l'origine, permettant donc une expression facile de l'activité protéolytique.

Malheureusement, ces résultats ne se sont montrés valables que pour le cas

particulier d'une préparation enzymatique. En effet, la figure 5 présente un réseau de courbes obtenues dans les mêmes conditions que le précédent, mais avec une préparation enzymatique différente, provenant du même fournisseur. Là, l'activité protéolytique n'est pas affectée par la concentration en substrat ; par contre $(E)_s$ l'est remarquablement, et dans un sens plus simple que précédemment puisque $(E)_s$ va croissant avec la concentration en bactohémoglobine.

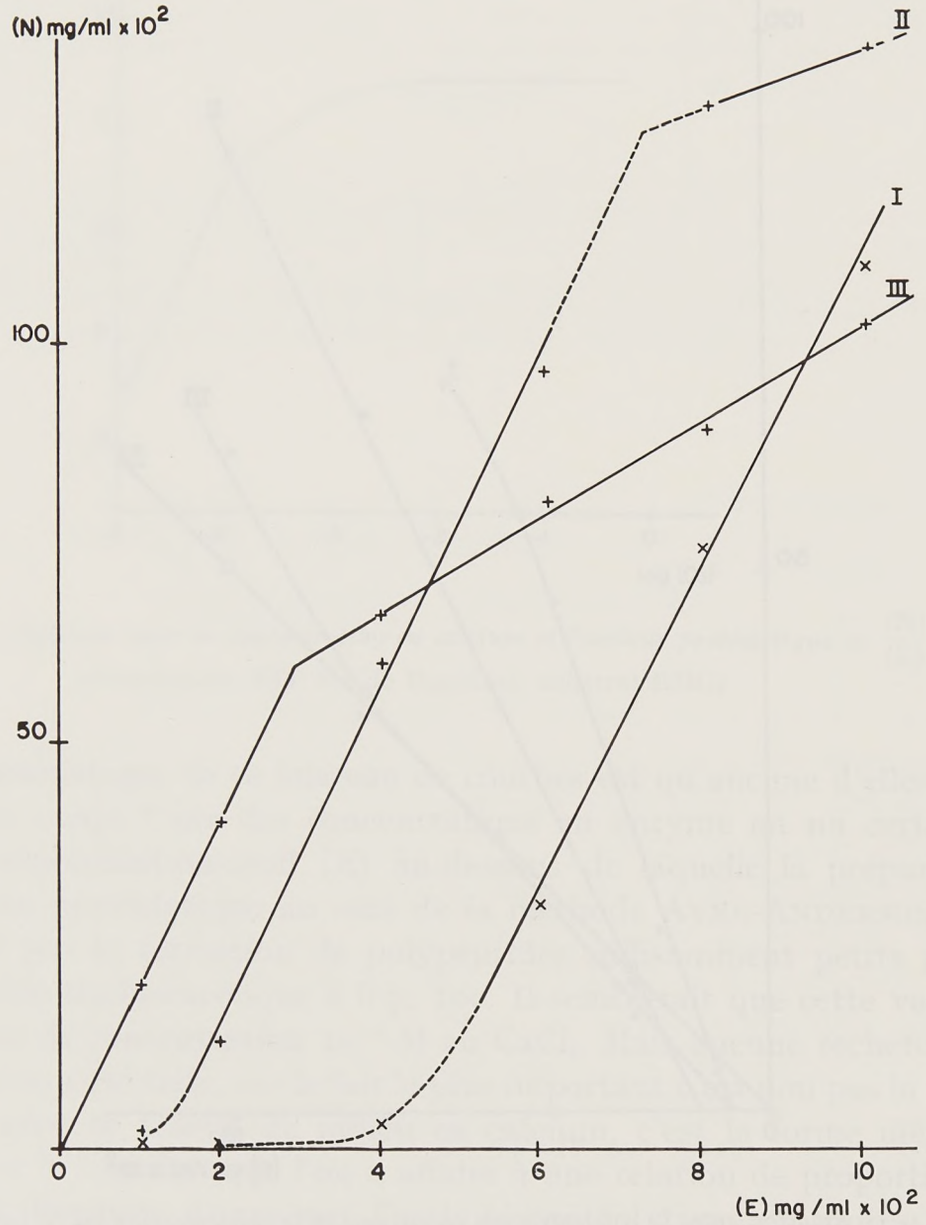


FIG. 5. — *Relation entre la concentration en enzyme et la concentration en N soluble, à diverses concentrations en substrat*

(Préparation 202.000 de Rapidase ; substrat BHG)

I : [S] = 2,5 p. 100 ; II : [S] = 5 p. 100 ; III : [S] = 10 p. 100

Nous pourrions multiplier les exemples. Je résumerai en disant seulement qu'il a été impossible de dégager un comportement constant à des enzymes différant par leur origine, c'est-à-dire qu'elles soient bactériennes ou fongiques, ou qu'elles proviennent de fournisseurs différents. Dans ces conditions nous avons conclu qu'il était impossible d'utiliser une telle méthode pour chiffrer l'activité protéolytique en général (ce qui n'est d'ailleurs pas surprenant).

RELATION ENTRE ACTION PROTÉOLYTIQUE SUR BACTOHÉMOGLOBINE ET ACTION SUR LE GLUTEN DE BLÉ

Si la méthode AYRE-ANDERSON n'est pas valable en tant que méthode de dosage, peut-être cependant l'action des protéases sur la bactohémoglobine pourrait-elle être mise en corrélation avec leur effet sur le gluten de blé.

Pour établir une telle comparaison avec plusieurs préparations enzymatiques, nous avons d'abord défini des concentrations que l'on pourrait qualifier d'isoactives, c'est-à-dire ayant la même activité vis-à-vis de la bactohémoglobine ; il est évident, après ce que nous venons de voir, que cette définition ne peut être qu'approchée. Pour minimiser les erreurs, nous avons choisi la concentration en enzyme qui assurait une concentration en azote soluble de 0,5 mg/ml, à une teneur de 5 p. 100 en bactohémoglobine. A partir de là, des solutions de chaque enzyme ont été préparées à des concentrations allant de 1/5 à 10 fois cette concentration repère. Ces solutions ont été utilisées pour reconstituer de petits pâtons de gluten à partir d'un stock de gluten

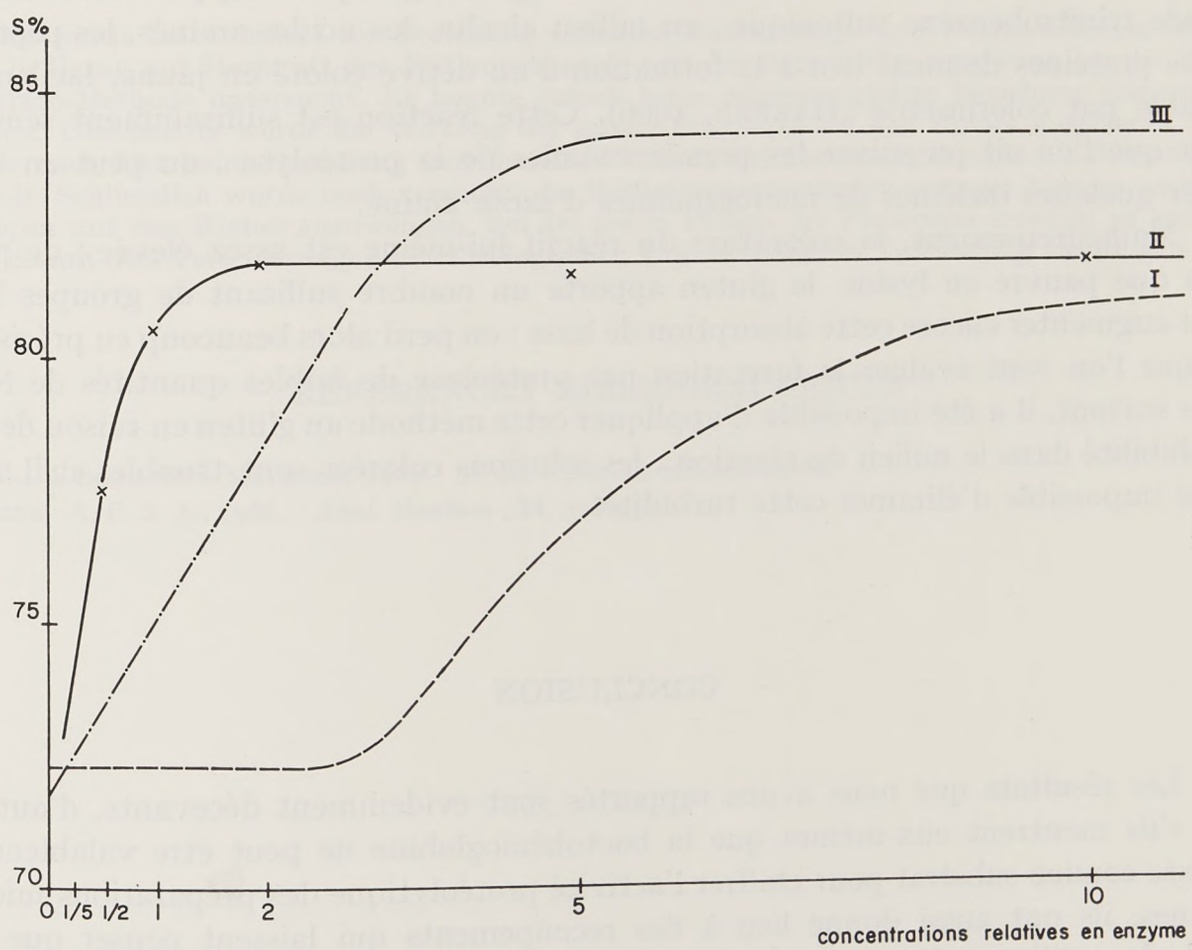


FIG. 6. — *Relation entre la solubilité du gluten et la concentration en enzymes de différentes origines, utilisées à doses isoactives vis-à-vis de BHG*

Enzymes	Concentrations 1
I	$0{,}9 \times 10^{-2}$ mg/ml
II	$3{,}5 \times 10^{-2}$ mg/ml
III	$10{,}0 \times 10^{-2}$ mg/ml

cryodesséché. Les pâtons ont été mis à incuber pendant 3 h ; puis on a jugé des effets de la protéolyse en mesurant la solubilité dans l'acide acétique N/100.

Neuf préparations enzymatiques ont été ainsi éprouvées. La figure 6 montre trois exemples, typiques. On voit clairement que des préparations qui ont des effets, sinon identiques du moins comparables, sur la protéolyse de la molécule de bactohémoglobine peuvent différer radicalement quant à leurs actions sur le réseau glutineux.

ESSAIS DE DOSAGE CHIMIQUE DES EFFETS DE LA PROTÉOLYSE

S'il est impossible de doser l'activité protéolytique d'une préparation ou même de prévoir son effet pratique en utilisant un substrat étranger, serait-il au moins possible de suivre au laboratoire par des méthodes chimiques l'action des protéases sur le gluten : c'est le troisième aspect du problème qui a été abordé au cours d'un travail que je ne ferai que mentionner, car il n'a pu aboutir. Nous avions projeté d'adapter au cas du gluten la méthode de dosage des groupes NH_2 par réaction avec l'acide trinitrobenzène sulfonique ; en milieu alcalin, les acides aminés, les peptides et les protéines donnent lieu à la formation d'un dérivé coloré en jaune, facilement dosable par colorimétrie (Habeeb, 1966). Cette réaction est suffisamment sensible pour que l'on ait pu suivre les premiers stades de la protéolyse : on peut en effet doser quelques dizièmes de microgrammes d'azote aminé.

Malheureusement, la coloration du réactif lui-même est assez élevée ; de plus, bien que pauvre en lysine, le gluten apporte un nombre suffisant de groupes NH_2 pour augmenter encore cette absorption de base : on perd alors beaucoup en précision, lorsque l'on veut évaluer la formation par protéolyse de faibles quantités de NH_2. Mais surtout, il a été impossible d'appliquer cette méthode au gluten en raison de son insolubilité dans le milieu de réaction : les solutions colorées sont troubles et il nous a été impossible d'éliminer cette turbidité.

CONCLUSION

Les résultats que nous avons rapportés sont évidemment décevants, d'autant que s'ils montrent eux-mêmes que la bactohémoglobine ne peut être valablement utilisée comme substrat pour chiffrer l'activité protéolytique des préparations microbiennes, ils ont aussi donné lieu à des recoupements qui laissent penser que les méthodes utilisant d'autres substrats ne donnent pas non plus de renseignements extrapolables à la technologie céréalière.

C'est dans ces conditions que les participants à l'Action concertée ont décidé d'orienter les efforts vers l'étude des procédés de rhéologie pratique, dans l'espoir de trouver là des moyens d'appréciation de l'activité protéolytique qui seraient au moins en rapport avec les effets observés en technologie.

SUMMARY

CRITICAL STUDY OF THE CHEMICAL METHODS OF TITRATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITIES

The relationship was examined, in particular, between the quantity of enzyme and the quantity of free nitrogen in terms of origin of enzyme preparations and concentration of substrate (bactohaemoglobin) in the AYRE-ANDERSON method : no relationship of general validity was found. Concurrently, the effects of the same preparations on gluten were compared : no correlation could be established between the actions on either substrate. Finally, we investigated whether it was possible to apply to gluten the methods of titrating very low quantities of NH_2 groups with a view to determining the first stages of proteolysis and connecting them with the modifications of the rheological properties.

ZUSAMMENFASSUNG

KRITISCHES STUDIUM DER CHEMISCHEN METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT

Es wurde insbesondere die Beziehung zwischen Enzymmenge und freigewordenem Stickstoff in Bezug auf Herkunft der Enzympräparate und der Substratkonzentration bei der Ayre Anderson-Methode untersucht. Es konnte jedoch keine allgemeingültige Beziehung festgestellt werden. Gleichzeitig wurde die Wirkung der selben Präparate auf den Kleber untersucht : Es wurde auch hier keine Beziehung zwischen der Wirkung auf das eine oder andere Substrat festgestellt. Schliesslich wurde noch versucht, die Bestimmungsmethoden geringer Mengen an NH_2-Gruppen auf den Kleber anzuwenden, um die ersten Phasen der Proteolyse erfassen zu können und sie mit den Veränderungen der rheologischen Eigenschaften in Verbindung zu bringen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CEREAL LABORATORY METHODS, 1962. 7e éd. : AACC, method 22-60.

HABEEB A. F. S. A., 1966. *Anal. Biochem.*, **14**, 328-336.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 233-239.

TESTS DE RHÉOLOGIE PRATIQUE UTILISABLES POUR L'APPRÉCIATION DES ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUES

M. BERGER, P. GRANDVOINNET,
J.-F. de la GUÉRIVIÈRE* et G. BUSSIÈRE*
avec la collaboration technique de A. S. SECK et R. GÉRARD

Grands Moulins de Pantin,
62, rue du Louvre,
75002 Paris

* *Centre technique des Unions,*
1, rue Montgolfier,
75003 Paris

RÉSUMÉ

Une étude comparée de l'action d'une préparation commerciale de protéases sur des pâtes testées au farinographe Brabender et à l'alvéographe Chopin a montré que ce dernier appareil est celui qui répond le mieux à un contrôle de l'activité de ces enzymes sur ces substrats particuliers. Il a été dégagé un paramètre variant linéairement en fonction de la dose d'enzyme ajoutée, et indépendamment de la qualité du substrat utilisé.

La comparaison des activités obtenues avec cette méthode et celle de AYRE et ANDERSON démontre la supériorité d'un test rhéologique simple, plus proche de la réalité industrielle.

INTRODUCTION

En plus des difficultés de manipulation présentées par la mise en œuvre de la méthode de AYRE et ANDERSON (1939) dans un laboratoire de contrôle, il est possible d'émettre un certain nombre de réserves sur l'utilisation en technologie des résultats obtenus. En effet, cette méthode consiste à faire agir l'enzyme sur un substrat hémoglobine à pH acide et en milieu liquide, conditions très éloignées de la pratique indus-

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 68-01-269-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

trielle (substrat glutineux, pH voisin de la neutralité et très faible hydratation en biscuiterie), et le mode d'appréciation de la protéolyse (azote trichloracétique soluble) ne reflète pas l'effet d'affaiblissement du réseau glutineux recherché en biscuiterie.

Ces considérations nous ont amenés à rechercher une méthode de dosage reflétant le plus possible les conditions technologiques d'utilisation tout en conservant un mode opératoire rapide et aisément réalisable.

MATÉRIELS ET APPAREILS UTILISÉS

1. — *Matériel*

a) *Préparations enzymatiques commerciales.*

— Enzyme BAL 5 de la Société Rapidase. Cette préparation commerciale d'enzyme protéolytique contient environ 1 700 unités amylase (I. C. C., 1962). Ce produit a été utilisé pour les essais à l'alvéographe Chopin et au farinographe Brabender.
— Enzyme protéolytique purifiée (exempte d'amylase) 23-637 de la Société Rhône-Poulenc.
— Enzyme protéolytique purifiée (exempte d'amylase) 25-048 de la Société Rhône-Poulenc.
— Préparation d'alpha-amylase fongique P 80 n° 288 de la Société Rapidase titrant 325 000 unités A/g.

b) *Farines de froment.*

Caractéristiques variables selon leur utilisation : biscotterie, W entre 175 et 215 ; boulangerie, W = 160 ; biscuiterie sèche, W = 115. Gluten et amidon de froment des Éts Roquette.

2. — *Appareils*

Farinographe Brabender.
Alvéographe Chopin.

RÉSULTATS OBTENUS

1. — *Farinographe Brabender*

Les essais ont été effectués sur une farine biscotte en ajoutant avec l'eau de coulage des quantités différentes de protéases BAL 5. Cependant, contrairement à Miller et Johnson (1951), nous n'avons pas ajouté d'alpha-amylases lors de nos essais. De plus, l'activité de l'enzyme est appréciée directement pendant le pétrissage et non après un temps de repos. En plus du comportement habituel des pâtes au cours du pétrissage, on observe sur les farinogrammes, à partir d'une certaine quantité de protéases, un point de rupture dans la courbe qui correspond à un changement plus ou moins soudain de l'aspect de la pâte dans le pétrin (on constate d'ailleurs un phénomène similaire lors de l'addition de réducteurs).

La lecture du tableau 1 amène aux conclusions suivantes.

La consistance maximale ne varie pas (ou d'une manière non significative) en fonction de la dose ajoutée, alors que l'on observe une augmentation de ce paramètre lors de l'adjonction d'un réducteur.

L'affaissement obtenu 12 mn après la consistance maximale peut être mis en corrélation sensiblement linéaire avec la dose d'enzyme ajoutée (jusqu'à 10 mg d'enzyme par g de farine) pour atteindre ensuite une valeur maximale.

Le moment d'apparition de la « déformation de la courbe » est une fonction inverse de la dose ajoutée.

TABLEAU I

Caractéristiques des farinogrammes obtenus par addition de doses croissantes de protéases

mg de prot./g de farine	Consistance maximum (UB)	Temps de formation de la pâte (mn)	t^* (mn)	Consistance en UB à t^*	Afft 12 mn après consistance maximum (UB)
0,00	480	1,5	—	—	80
1,67	480	1	—	—	140
3,33	500	1	11	340	150
5,00	480	1	7	350	230
6,67	470	1	6,5	350	260
10,00	500	1	4,5	370	340
16,67	500	1	3,5	400	350

t^* = temps au bout duquel apparaît la déformation.

2. — *Alvéographe Chopin*

Les essais ont été menés en faisant agir sur des substrats qualitativement différents (farines de froment à utilisation biscottière, boulangère et biscuitière, ainsi qu'une farine supplémentée en gluten ou en amidon) quatre préparations enzymatiques : BAL 5, deux protéases Rhône-Poulenc et une amylase fongique.

Les résultats que nous avons obtenus en effectuant des alvéogrammes dans les conditions habituelles (6 mn de pétrissage et 20 mn de repos) confirment par l'aspect général des courbes ceux obtenus par PETIT et AUDIDIER (1967).

Nous avons cherché quels étaient les paramètres les plus significatifs de l'action de l'enzyme et dont la détermination soit la moins sujette à variation. Les courbes que l'on obtient montrent que d'emblée nous avons dû écarter G à cause du manque d'homogénéité des résultats obtenus et par conséquence W qui lui est étroitement lié.

Notre choix s'est fixé sur :

— P_M (pression maximale) parce que c'est le seul paramètre classique qui évolue continuellement dans le même sens et que sa détermination avec une assez bonne précision est relativement aisée.

— P_2 (pression lue à 2 cm de l'origine) parce que ce point traduit la concavité de la courbe et que de plus cette grandeur est susceptible de varier dans d'assez larges proportions (alors que la pression à l'éclatement non seulement est fonction de G mais tend plus rapidement vers une valeur asymptotique).

Nous avons alors tracé les graphes :

$$\frac{P_M}{P_2} \cdot 10^2 \qquad f \text{ (g d'enzymes/250 g de farine)}.$$

On obtient ainsi des régressions linéaires dont les ordonnées à l'origine sont fonction du type de farine, mais dont les pentes sont sensiblement constantes pour une même enzyme. Nous avons ainsi obtenu avec les 3 protéases et la préparation d'alpha-amylase, les droites d'équations suivantes :

a) *Protéases BAL* 5.

Farine W = 117 (7 couples de valeurs)

$y = 69{,}33 - 39{,}14\ x \qquad r = -0{,}981$

Farine W = 162 (6 couples de valeurs)

$y = 71{,}15 - 38{,}52\ x \qquad r = -0{,}997$

Farine W = 175

sans adjonction de gluten (7 couples de valeurs)

$y = 66{,}09 - 45{,}12\ x \qquad r = -0{,}936$

avec adjonction de gluten

— 2 p. 100 (W = 195) (6 couples de valeurs)

$y = 75{,}77 - 44{,}21\ x \qquad r = -0{,}961$

— 5 p. 100 (W = 254) (7 couples de valeurs)

$y = 83{,}70 - 47{,}21\ x \qquad r = -0{,}980$

avec adjonction d'amidon

— 20 p. 100 (W = 119) (4 couples de valeurs)

$y = 66{,}65 - 46{,}25\ x \qquad r = -0{,}830$

Farine W = 214 (9 couples de valeurs)

$y = 73{,}16 - 34{,}93\ x \qquad r = -0{,}922$

Soit une moyenne des pentes de 41,5 (exception faite de la régression obtenue avec 20 p. 100 d'amidon).

b) *Protéase* 23-637 *de Rhône-Poulenc.*

$y = 67{,}74 - 817\ x \qquad r = -0{,}834$

c) *Protéase* 25-048 de *Rhône-Poulenc*

$y = 68{,}34 - 2\,325\ x \qquad r = -0{,}922$

d) *Préparation d'alpha-amylase fongique de la Sté Rapidase*

$y = 64{,}32 - 16{,}41\ x \qquad r = -0{,}987.$

Dans ces équations :

$y =$ rapport $\dfrac{P_2}{P_M} \cdot 10^2$

$x =$ gramme de protéase/250 g de farine.

Les coefficients angulaires des droites ainsi calculés permettent donc d'apprécier l'activité d'une préparation enzymatique, de comparer entre elles les activités de différentes préparations commerciales.

La confirmation de la validité de la méthode que nous proposons a été simultanément apportée par le C. T. U. (Centre de Formation technique et de Perfectionnement des Unions intersyndicales de Biscuiterie-Biscotterie).

Des essais analogues à ceux préalablement décrits ont été réalisés à l'aide de l'alvéographe Chopin avec différents types de protéases commerciales. On a calculé les rapports (K) des pentes de chacune des enzymes considérées sur celle d'une enzyme préalablement testée en technologie de biscuiterie sèche sucrée. L'enzyme prise comme référence est la « protéinase NOVO » et les rapports obtenus sont groupés dans le tableau 2.

TABLEAU 2

Enzyme	K
NOVO : Protéinase	1,00
Sté Rapidase B 1 500	1,20
Sté Rapidase BAL 60	12,00
Sté Rapidase BAL 5	60,00
Rhône-Poulenc 23-637	1,33

L'établissement de ces rapports permet alors de connaître les doses de protéases d'origines commerciales diverses qu'il convient d'ajouter dans une fabrication donnée, compte tenu de l'optimum technologique déterminé pour la protéinase NOVO. Par exemple, si l'optimum est de 300 p.p.m. en NOVO, il faudrait utiliser :

$$300 \times 60 = 18\,000 \text{ p.p.m. de BAL 5}$$

pour obtenir des résultats voisins en fabrication. C'est ce qu'ont confirmé les essais de cuisson effectués selon 2 modes opératoires : faible concentration d'enzymes et

TABLEAU 3

Enzymes	Temps de repos de pâte court		Temps de repos de pâte long	
	Rétraction (en p. 100)	Largeur du biscuit (en cm)	Rétraction (en p. 100)	Largeur du biscuit (en cm)
Témoin	—	—	90,4	5,46
NOVO	50,0	6,09	47,8	5,97
BAL 50	52,1	5,95	47,8	5,95
BAL 5	56,5	5,91	50,0	5,96
B 1 500	50,0	6,03	47,8	5,98
R. P. n° 1	43,5	6,24	43,5	6,14

temps de repos de pâte longs (18 heures), forte concentration d'enzymes et temps de repos de pâte courts (3 heures).

Nous ne retiendrons ici que deux des paramètres ayant permis d'apprécier la qualité des produits (tabl. 3) : la rétraction de la pâte à la sortie du laminoir, la « largeur » du biscuit après cuisson.

Seule donc la protéase R. P. semble donner des résultats légèrement différents, écarts qui se confirment par ailleurs à l'examen des autres paramètres d'appréciation des produits finis (coloration, friabilité, masticabilité). On peut peut-être expliquer cette différence par le fait qu'elle est la seule enzyme non issue de *Bacillus subtilis* mais de *Streptomyces*.

CONCLUSION

Il semble bien que la comparaison directe de l'action de préparations commerciales d'enzymes protéolytiques à l'aide de l'alvéographe Chopin permette au technologue de déterminer et/ou de comparer l'efficacité de celles-ci, soit à la réception, soit en cours d'entreposage, soit encore entre différents lots provenant du même fournisseur pour s'assurer de la constance de la fabrication au cours du temps.

L'alvéographe Chopin doit, à notre sens, être préféré au farinographe Brabender de par la nature des renseignements fournis et de par la fiabilité des résultats, tant au plan de la répétabilité qu'à celui de la reproductibilité inter-laboratoires.

SUMMARY

PRACTICAL RHEOLOGY TESTS FOR THE VALUATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITIES

A comparative study of the action of a commercial preparation of proteases on doughs tested with Brabender's farinograph and extensigraph and also with Chopins' alveograph showed that the latter apparatus was the most suitable one for controling these enzymes. A parameter was found that varies linearly in terms of the amount of enzyme added and independently of the quality of the substrate used. Comparison of the activities obtained with this method and the Ayre and Anderson method shows the superiority of a rheological test closer to the industrial reality.

ZUSAMMENFASSUNG

RHEOLOGISCHE TESTE ZUR BESTIMMUNG DER PROTEOLYTISCHEN AKTIVITÄT

Ein vergleichendes Studium der Aktivität eines handelsüblichen Proteasenpräparates auf Teige im Brabender-farinographen und Extensographen sowie im Chopin Alveographen hat gezeigt, dass der letztere sich am besten für die Kontrolle der Enzyme eignet. Es wurde ein Parameter festgestellt, der linear mit der zugesetzten Enzymmenge variiert und unabhängig von dem verwendeten Substrat ist. Der Vergleich zwischen den erhaltenen Resultat en mit den Ergebnissen der Ayre Anderson-Methode zeigt, dass der rheologische Test geeigneter und industriell reeler ist.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AYRE A., ANDERSON A., 1939. Varietal differences in barleys and malts. Autolytic proteolytic activity of malt and its correlations with wort nitrogen and barley nitrogen fractions. *Canad. J. Res.*, (8), 239-246.

BYRON S., MILLER B. S., 1947. A critical study of the modified AYRE and ANDERSON method for the determination of proteolytic activity. *Ass. off. agric. Chem.*, **34** (4), 659-669.

BYRON S., JOHNSON J. A., 1948. High levels of alpha-amylase in baking. II. Proteolysis in straight and sponge doughs. *Cereal Chem.*, **25**, 178-190.

BYRON S., MILLER B. S., JOHNSON J. A., 1951. A simple linear relationship and definition of a unit for proteinase activity. *Arch. Biochem.*, **32**, 200-206.

BYRON S., JOHNSON J. A., 1953. The relationship between dough consistency proteolytic activity. *Cereal Chem.*, 471-479.

CEREAL LABORATORY METHODS, 1962. Method 22-60.

LEE, 1967. A new unit for proteolytic activity determined by the modified AYRE and ANDERSON method. *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 541-543.

PETIT L., AUDIDIER Y., 1967. Action des protéinases dans les industries de cuisson. *Ann. Nutrit. Aliment.*, **21** (6), B 341-360.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 241-247.

TESTS DE RHÉOLOGIE PRATIQUE UTILISABLES POUR L'APPRÉCIATION DES ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUES

A. COLAS

Laboratoires A. R. I. A.,
65, Quai de la Gare,
75013 Paris

RÉSUMÉ

On expose comment l'alvéographe Chopin peut permettre d'apprécier l'activité protéolytique d'un mélange farine-protéase.

INTRODUCTION

On connaît depuis longtemps l'utilisation de l'alvéographe Chopin pour déceler la présence des blés punaisés dans un lot de grains ; les textes officiels avant 1948 basaient en effet la réfaction concernant ces grains sur la « virulence » de l'attaque. Cette virulence V était donnée par la formule :

$$V = \frac{W_t - W_m}{W_t} \times 100$$

où W_t représente le W Chopin d'une farine témoin après un repos de 3 heures et W_m le W Chopin après 3 heures également de cette même farine additionnée de 5 p. 100 de la farine suspectée d'être attaquée par les punaises.

En fait, il est préférable d'apprécier l'état des farines punaisées par l'indice de dégradation ou indice d'affaiblissement du W

$$A = \frac{W_{20} - W_{180}}{W_{20}} \times 100$$

où W_{20} représente le W Chopin selon la méthode classique, c'est-à-dire après 20 minutes de repos, et W_{180} celui après 180 minutes de repos.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 68-01-213-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

Les dégâts causés par les diastases salivaires de la punaise étant d'origine protéolytique, nous avons pensé utiliser l'alvéographe avec repos pour apprécier l'activité protéolytique de mélanges farines-protéases.

MÉTHODE UTILISÉE

Une des méthodes préconisées par Chopin consiste à extraire 6 pâtons et à passer à l'alvéographe 3 pâtons après 20 minutes de repos et 3 après 180 minutes de repos. On part ainsi de la même pâte, ce qui élimine un certain nombre de risques d'erreur. Nous préférons faire deux essais séparés avec le nombre de pâtons habituels, le premier essai après 20 minutes de repos et le second après 180 minutes.

RÉSULTATS OBTENUS

A. — *Étude de la protéase 23 637 R. P.*

Il s'agit d'une protéase fongique ayant pour origine un *Streptomyces* et d'activité alpha-amylasique nulle (cf. article sur l'isolement, la purification et les propriétés de cette protéase). Elle se présente sous la forme d'une poudre lyophilisée de couleur beige facilement soluble dans l'eau. Son optimum d'action lors de l'hydrolyse de la caséine se situe à 50°C, mais elle est déjà très active à 25°C. Son pH optimum d'action est de 8,5, mais son activité est déjà importante à pH 5,5.

Nos essais ont consisté à étudier le comportement de cette enzyme à l'alvéographe Chopin avant d'effectuer des essais de panification.

a) *Essais à l'alvéographe Chopin.*

Le protocole opératoire est résumé dans le tableau I.

TABLEAU I

	Dose utilisée (par rapport à la farine)	Alvéographe Chopin			
		P	G	W	P/L
Repos 20 minutes	Témoin	43	25,5	150	0,33
	10 p.p.m.	45	25,2	143	0,34
	25 p.p.m.	37	24,3	104	0,31
	40 p.p.m.	33	23,7	80	0,29
	50 p.p.m.	30	23,6	67	0,27
	100 p.p.m.	23	—	—	—
	200 p.p.m.	15	—	—	—
Repos 180 minutes	Témoin	37	25,3	133	0,28
	10 p.p.m.	32	22,9	83	0,31
	25 p.p.m.	26	18,8	43	0,38
	40 p.p.m.	22	14,5	25	0,57
	50 p.p.m.	20	—	—	—

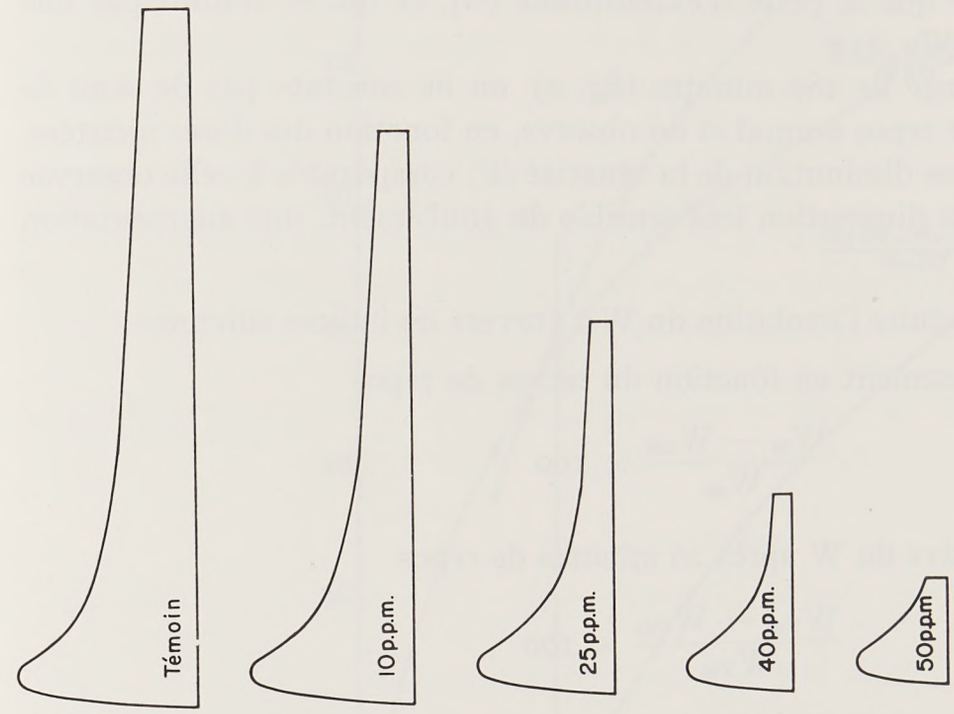


FIG. 2. — *Essais à l'alvéographe Chopin après repos de 180 minutes*

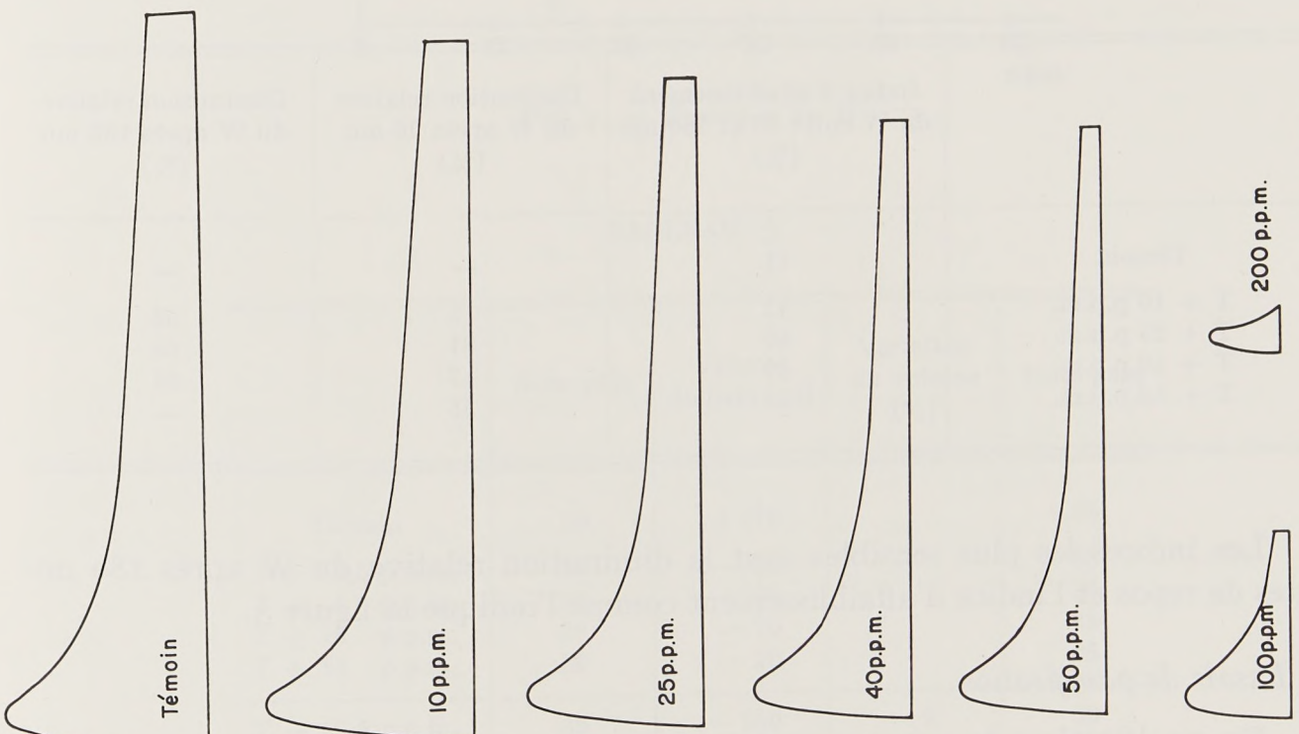


FIG. 1. — *Essais à l'alvéographe Chopin après repos de 20 minutes*

Avec le repos normal de 20 minutes (fig. 1), les caractéristiques P, G, W, P/L ne sont pratiquement pas modifiées pour la dose la plus faible. Aux doses suivantes P, G, W, P/L décroissent régulièrement mais on note que la diminution de la ténacité (P) est plus sensible que la perte d'extensibilité (G), ce qui se traduit par une diminution du rapport P/L.

Avec le repos prolongé de 180 minutes (fig. 2), on ne constate pas de seuil de sensibilité comme avec le repos normal et on observe, en fonction des doses ajoutées, une diminution du W, une diminution de la ténacité (P) comparable à celle observée avec le repos normal, une diminution très sensible du gonflement, une augmentation nette du rapport P/L.

On peut essayer de traduire l'évolution du W à travers les indices suivants :

— Indice d'affaiblissement en fonction du temps de repos

$$\frac{W_{20} - W_{180}}{W_{20}} \times 100$$

— Diminution relative du W après 20 minutes de repos

$$\frac{W_{T20} - W_{P20}}{W_{T20}} \times 100$$

— Diminution relative du W après 180 minutes de repos

$$\frac{W_{T180} - W_{P180}}{W_{T180}} \times 100$$

TABLEAU 2

	Indice d'affaiblissement du W entre 20 et 180 mn (%)	Diminution relative du W après 20 mn (%)	Diminution relative du W après 180 mn (%)
Témoin	11	—	—
T + 10 p.p.m.	42	5	38
T + 25 p.p.m.	60	31	68
T + 40 p.p.m.	69	47	81
T + 50 p.p.m.	—	55	—

Les indices les plus sensibles sont la diminution relative du W après 180 minutes de repos et l'indice d'affaiblissement comme l'indique la figure 3.

b) *Essais de panification.*

En panification, les essais ont été réalisés avec des incorporations variant de 2,5 p.p.m. à 22,5 p.p.m. et l'on a obtenu les résultats figurant dans le tableau 3.

Compte tenu de la sensibilité de la méthode de panification, nous considérons que les résultats sont indifférents jusqu'à 15 p.p.m., après quoi on observe une détério-

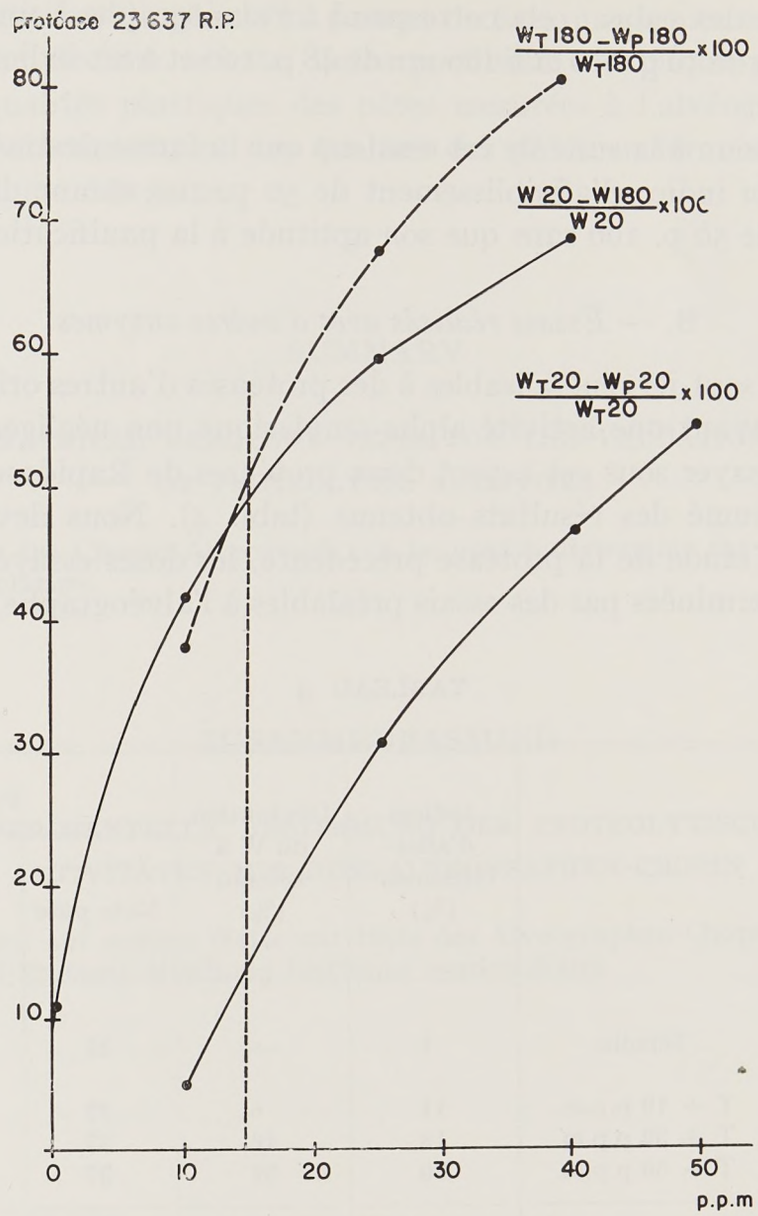


FIG. 3. — *Évolution du W*

TABLEAU 3

	Note pâte	Volume du pain (ml)	Variation du volume (%)	Note pain
Témoin	39	1 670		36
T + 2,5 p.p.m.	39	— 20		35
T + 5 p.p.m.	39	+ 30		36
T + 10 p.p.m.	39	— 70		35
T + 15 p.p.m.	39	— 20		36
T + 17,5 p.p.m.	39	— 150	— 9	33
T + 20 p.p.m.	39	— 185	— 11	33
T + 22,5 p.p.m.	39	— 225	— 13	33

ration du volume des pains ; cela correspond à l'alvéographe à une diminution relative de W à 20 mn de 10 p. 100 et à 180 mn de 48 p. 100 et à un indice d'affaiblissement de 50 p. 100.

Notre conclusion à la suite de cet essai est que la farine destinée à la boulangerie peut supporter un indice d'affaiblissement de 50 p. 100 et une diminution relative de W à 180 mn de 50 p. 100 sans que son aptitude à la panification en soit affectée.

B. — *Essais réalisés avec d'autres enzymes*

Ces résultats sont-ils généralisables à des protéases d'autres origines (bactérienne par exemple) et ayant une activité alpha-amylasique non négligeable ? Nous avons eu l'occasion d'essayer sous cet aspect deux protéases de Rapidase et nous donnons ci-dessous un résumé des résultats obtenus (tabl. 4). Nous devons préciser que, contrairement à l'étude de la protéase précédente, les doses essayées en panification n'ont pas été déterminées par des essais préalables à l'alvéographe.

TABLEAU 4

Enzymes		Indices d'affaiblissement (%)	Diminution du W à 180 mn (%)	Panification		
				Note pâte	Volume du pain (ml)	Note pain
Chromase (bactérienne)	Témoin	1	—	37	1 662	37
Activité alpha-amylasique 16 450 UA	T + 10 p.p.m.	11	6	37	1 760	38
	T + 30 p.p.m.	18	16	37	1 685	37
	T + 50 p.p.m.	30	31	37	1 625	37
BAL 50 (bactérienne)	Témoin	7	—	38	1 640	38
Activité alpha-amylasique 5 200 UA	T + 40 p.p.m.	58	64	37	1 580	33
	T + 80 p.p.m.	76	83	23	1 400	25
	T + 160 p.p.m.	non mesurable	non mesurable	11	1 125	11

Dans le premier cas, on ne note pas d'action mesurable des protéases et à l'alvéographe l'indice d'affaiblissement et la diminution du W à 180 mn ne dépassent pas 30 p. 100. Dans le deuxième cas, la première dose essayée est déjà trop élevée pour la panification et à l'alvéographe l'indice d'affaiblissement est monté à 58 p. 100 alors que la diminution du W à 180 mn est de 64 p. 100.

CONCLUSION

Les résultats exposés ici ont été extraits d'une longue série d'essais qui se sont révélés décevants quant aux possibilités d'utilisation d'enzymes protéolytiques en panification. Nous avons seulement voulu indiquer comment l'alvéographe Chopin,

dans certaines conditions d'utilisation, permet de fixer une limite au-delà de laquelle l'addition d'enzyme devient néfaste. Cette possibilité s'explique par le fait que la dégradation des qualités plastiques des pâtes mesurées à l'alvéographe Chopin est en relation avec l'amenuisement des qualités des pâtes en fermentation et avec la diminution du volume des pains.

SUMMARY

PRACTICAL RHEOLOGY TESTS FOR THE VALUATION OF PROTEOLYTIC ACTIVITIES

It is shown how the Chopin Alveograph can be used to determine the proteolytic activity of a flour-protease mixture.

ZUSAMMENFASSUNG

EXPERIMENTELLE BESTIMMUNG DER PROTEOLYTISCKEN AKTIVITÄTEN MIT DEM ALVEOGRAPHEN-CHOPIN

Es wird erläutert, auf welche Weise mit Hilfe des Alveographen-Chopin die proteolytische Aktivität einer Mehl-Protease-Mischung bestimmt werden Kann.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 249-256.

ÉTUDE DE L'ACTION DES PROTÉASES SUR LA FARINE DE BLÉ AU MOYEN DU FARINOGRAPHE BRABENDER

P. DUCROO

Société Rapidase,
B. P. 139, 59113 Seclin

RÉSUMÉ

Le Centre technique des Unions a montré l'intérêt d'utiliser la protéase neutre du *Bacillus subtilis* dans des fabrications biscuitières pauvres en matières grasses. Cette adjonction conduit à des effets très spectaculaires, à la fois du point de vue technologique et organoleptique.

On a pensé qu'il était intéressant de tester différentes protéases d'après leur action sur le gluten de la farine dans des conditions d'hydratation proches de celles des fabrications biscuitières. On a réalisé cette étude au farinographe Brabender.

INTRODUCTION

Quelques auteurs ont utilisé le farinographe pour étudier l'action des protéases sur la farine, mais leur principal objectif était de mettre au point une méthode de dosage de l'activité de ces enzymes. C'est ainsi que LANDIS en 1935 définissait une unité d'enzyme protéolytique sur la base d'un certain taux d'abaissement de consistance de la pâte.

Plus tard, JOHNSON et MILLER (1949) ont mis en évidence le rôle de l'alpha-amylase sur la rhéologie des pâtes et défini une technique pour l'étude de l'activité protéolytique au farinographe.

Si les méthodes chimiques de dosage des activités protéolytiques n'ont jamais permis d'obtenir des résultats comparables à ceux observés en technologie, le farinographe n'a pas apporté, non plus, de solution parfaite à ce problème. La sensi-

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-223-02-212-75-01) que nous remercions de son aide.

bilité de cet appareil est insuffisante pour mettre en évidence des activités protéolytiques faibles dont l'effet technologique peut être cependant très important, en panification notamment. De plus, il est très rare de rencontrer deux appareils donnant les mêmes résultats. Cependant, sa facilité d'emploi rend le farinographe Brabender intéressant lorsqu'il s'agit d'étudier des activités protéolytiques fortes comme c'est le cas dans certaines fabrications biscuitières.

Pour notre part, nous nous sommes bornés à l'étude comparative des différents types de protéases disponibles actuellement sur le marché. Nous avons étudié l'influence du pH et de la température et comparé leurs actions à égalité d'activité protéolytique sur caséine. Toutes les enzymes utilisées au cours de ces essais ont été purifiées suivant les techniques décrites dans l'article sur la purification et les propriétés des protéases bactérienne et fongique (Delecourt, 1974).

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Nous avons utilisé, pour tous les essais, la farine U. S. Corde Violette, type 55, des Grands Moulins de Paris, usine de Marquette. L'activité protéolytique de cette farine correspond à 4,9 HU/g selon la méthode Ayre-Anderson. Les essais ont été faits à 30°C, la farine et les solutions étant préalablement portées à cette température. Nous avons utilisé la vitesse rapide du farinographe Brabender.

La solution d'hydratation contenait 25 g/l de chlorure de sodium et 200 mg/l de chlorure de calcium anhydre dans l'eau distillée. Cette teneur en chlorure de calcium correspond à une dureté de 17,5 degrés hydrotimétriques français.

Pour 300 g de farine, nous avons ajouté 135 ml de solution saline et 5 ml de solution enzymatique. La teneur en chlorure de sodium calculée sur la farine était de l'ordre de 1,1 p. 100. Les solutions saline et enzymatique étaient ajoutées à la farine en même temps. Le taux d'hydratation était, par conséquent, de 46,7 p. 100. Nous avons choisi ce faible taux d'hydratation pour deux raisons : d'une part, nous voulions obtenir une consistance élevée de la pâte témoin afin d'utiliser toute la largeur du graphique et ainsi mieux juger de l'action des protéases ; d'autre part, nous voulions surtout étudier l'influence de ces protéases dans les conditions d'une pâte biscuitière à hydratation faible, le farinographe n'étant pas suffisamment sensible pour étudier des protéolyses légères réalisées parfois sur les pâtes boulangères.

Le temps de pétrissage a été, dans tous les cas, de 15 mn ; nous n'avons retenu que deux paramètres : la consistance moyenne de la pâte, l'amplitude que nous avons définie comme la largeur du trait tracé sur le graphique.

L'action protéolytique a été déterminée en calculant le pourcentage d'abaissement de la consistance ou de l'amplitude par rapport à l'essai témoin sans addition d'enzyme, effectué dans les mêmes conditions de pH et de température. Pour étudier l'influence du pH, nous avons préféré mélanger à sec, à la farine, des doses variables d'acide citrique ou de carbonate de sodium pulvérisés afin d'éviter de porter la solution enzymatique à un pH extrême au moment de l'hydratation. Les doses maximales utilisées, calculées sur farine, ont été de 0,66 p. 100 d'acide citrique pour pH 4,0 ; 0,02 p. 100 de carbonate de sodium pour pH 7,5. Le pH normal de la farine était de 5,80. Après chaque essai, nous avons vérifié le pH dans la pâte et n'avons jamais enregistré de changement notable au cours de la protéolyse.

Toutes les enzymes utilisées pour cette étude ont été partiellement purifiées et nous avons étudié particulièrement 3 protéases bactériennes du *Bacillus subtilis* dont 1 protéase bactérienne neutre et 2 protéases bactériennes alcalines. La protéase bactérienne neutre est une métalloenzyme puisqu'un atome de zinc contribue à la constitution de la molécule. Cette protéase est calcium dépendante et est inhibée entre autres par l'ortho-phénanthroline, l'EDTA et les ions phosphate. Les 2 protéases bactériennes alcalines du type subtilisines possèdent un groupe sérine dans leurs sites actifs. La protéase alcaline n° 1 possède un pH optimum de 8,5-9,0 sur caséine alors que la protéase alcaline n° 2 a son optimum à pH 9,5-10.

Trois protéases fongiques ont été également étudiées : les protéases F I et F II sont des protéases neutres sécrétées par deux souches différentes d'*Aspergillus oryzae* ; la protéase F III est une protéase acide sécrétée également par un *Aspergillus oryzae*.

Nous avons aussi réalisé quelques essais avec une papaïne purifiée.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La figure 1 montre l'influence de la variation du pH sur le comportement de la farine sans addition d'enzymes. La consistance varie fortement de 660 UB pour pH 4,0 à 850 UB pour pH 7,5. Par contre, l'amplitude est restée constante à 120 UB pour toutes les valeurs de pH. Le fait est très probablement en relation avec le taux de gonflement du gluten en fonction du pH et non pas avec l'activité des protéases présentes dans la farine.

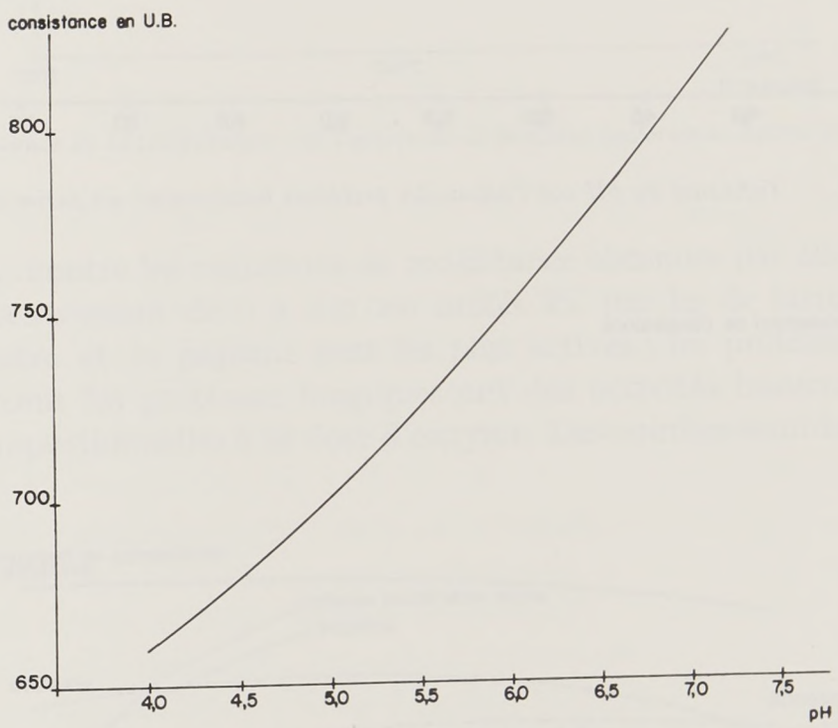


FIG. 1. — *Influence du pH sur le comportement de la farine au farinographe*

La figure 2 indique l'abaissement de consistance observé en fonction du pH avec les trois protéases bactériennes que nous venons de définir. La protéase neutre est la plus active et présente un optimum à pH 6,5-7,0. Les protéases alcalines I et II ont le même pH optimum, mais leurs activités semblent plus faibles en particulier pour la protéase n° 1.

La figure 3 montre la même action réalisée avec les protéases fongiques. On constate, en général, un faible abaissement de consistance ainsi qu'un optimum de pH peu net. La protéase acide F III possède, quand même, une activité plus importante en milieu acide.

Il y a, à notre avis, deux explications à l'aplatissement de ces courbes : la première est que les variations de consistance obtenues avec les protéases fongiques sont

faibles, la deuxième, que ces protéases sont assez difficiles à purifier et contiennent probablement des quantités non négligeables d'autres protéases ayant des pH optima différents.

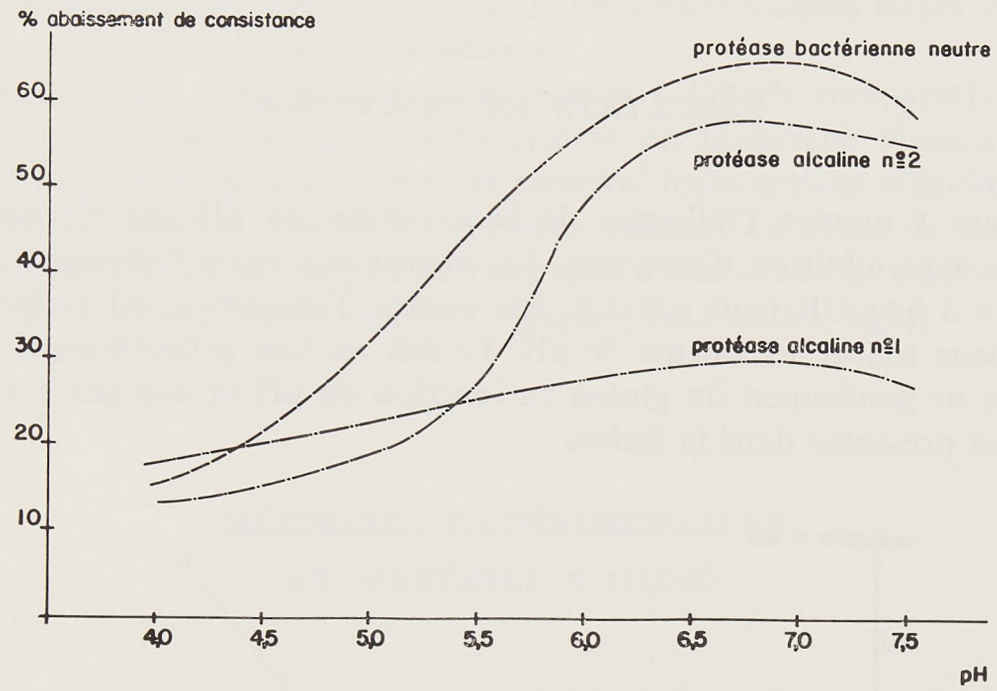


FIG. 2. — *Influence du pH sur l'action des protéases bactériennes au farinographe*

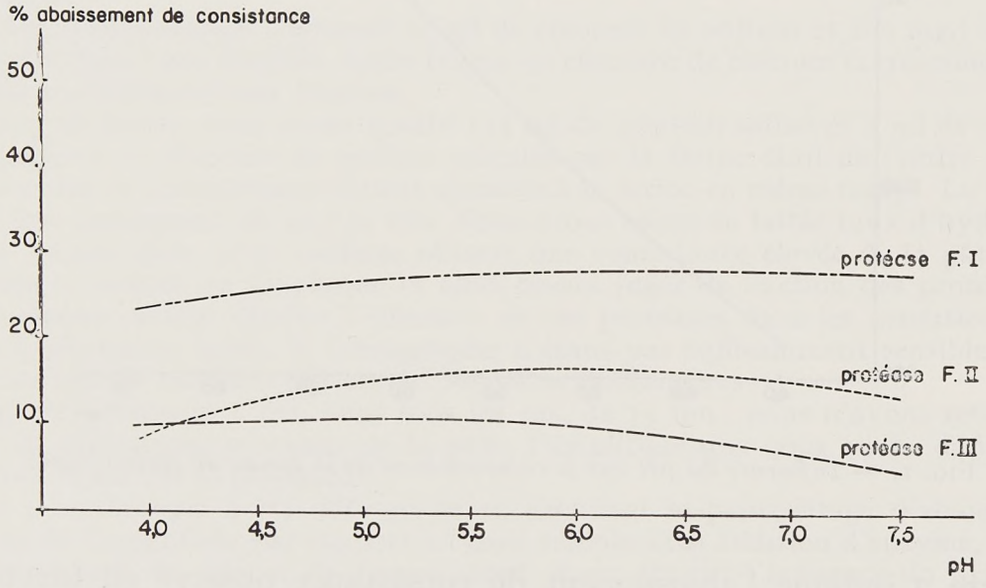


FIG. 3. — *Influence du pH sur l'action des protéases fongiques au farinographe*

L'influence de la température dans les limites normales du travail des pâtes n'est pas négligeable. Sans addition d'enzymes, la consistance de la farine passe de 920 UB pour 25°C à 710 UB pour 35°C. Parallèlement, l'amplitude passe de 145 UB à 100 UB alors que celle-ci était restée constante à 120 UB au cours des variations de pH. Après addition d'une même dose de protéase bactérienne neutre, nous avions une consistance de 540 UB pour 25°C et 240 UB pour 35°C. Exprimé en pourcentage d'abaissement de consistance, nous obtenons la figure 4.

L'influence de la concentration enzymatique a été étudiée au pH optimum de chaque protéase. Les activités enzymatiques ont été exprimées en pouvoir caséinolytique, cette méthode consistant à hydrolyser la caséine à pH 7,0 et 37°C.

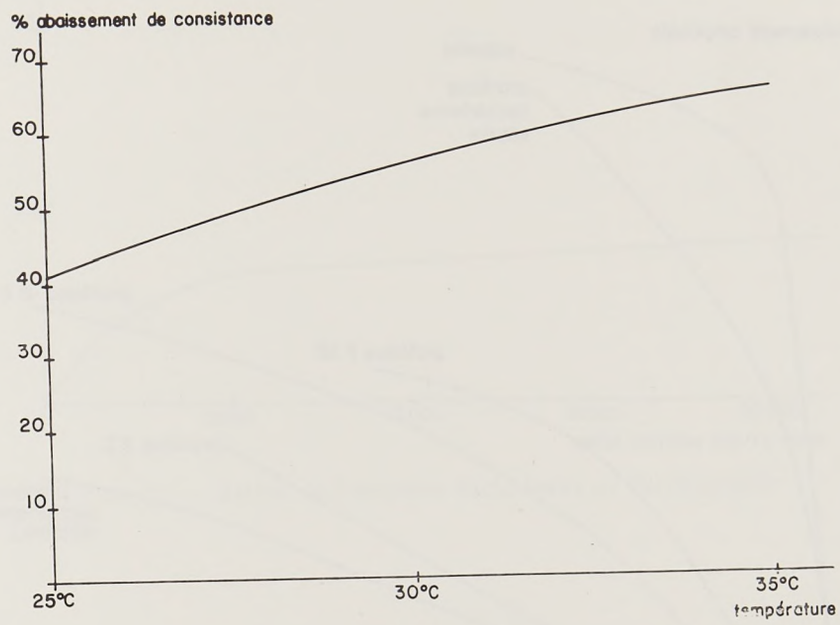


FIG. 4. — *Influence de la température sur l'action de la protéase bactérienne neutre au farinographe*

La figure 5 montre les variations de consistance obtenues par addition de quantités de protéases variant de 0 à 200 000 unités PC par kg de farine. La protéase bactérienne neutre et la papaïne sont les plus actives ; les protéases bactériennes alcalines et surtout les protéases fongiques ont des activités beaucoup plus faibles qui semblent proportionnelles à la dose d'enzyme. Des courbes semblables sont obte-

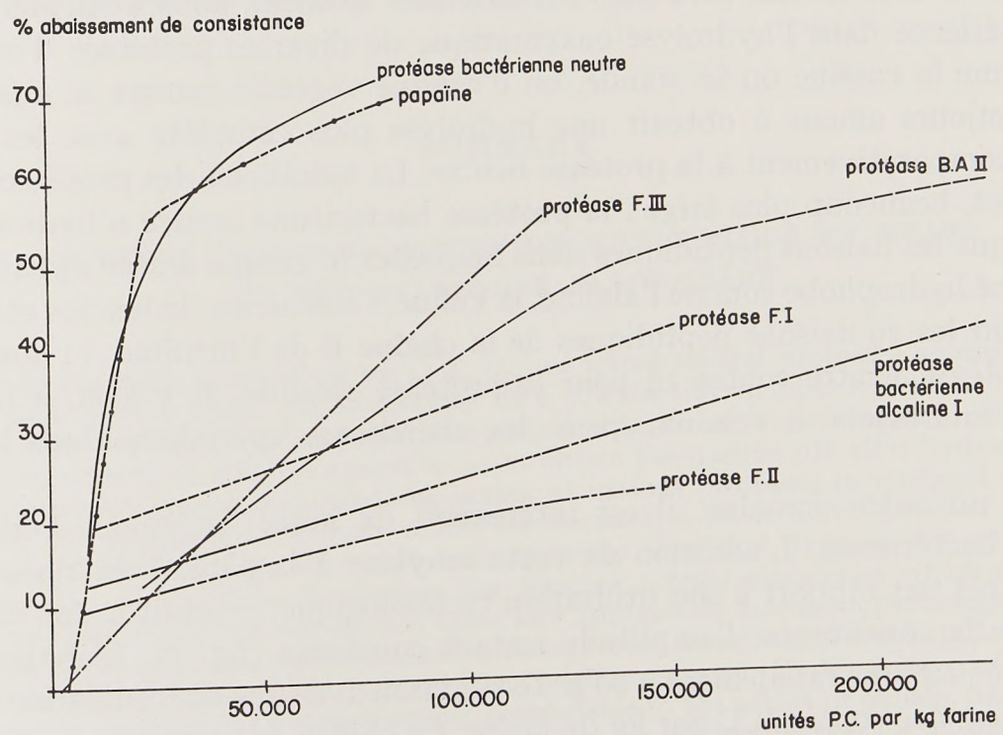


FIG. 5. — *Influence de la dose de protéase au farinographe*

nues en portant les variations d'amplitude en fonction de la concentration enzymatique (fig. 6), la papaïne se singularise cependant de la protéase bactérienne neutre par une activité encore accentuée.

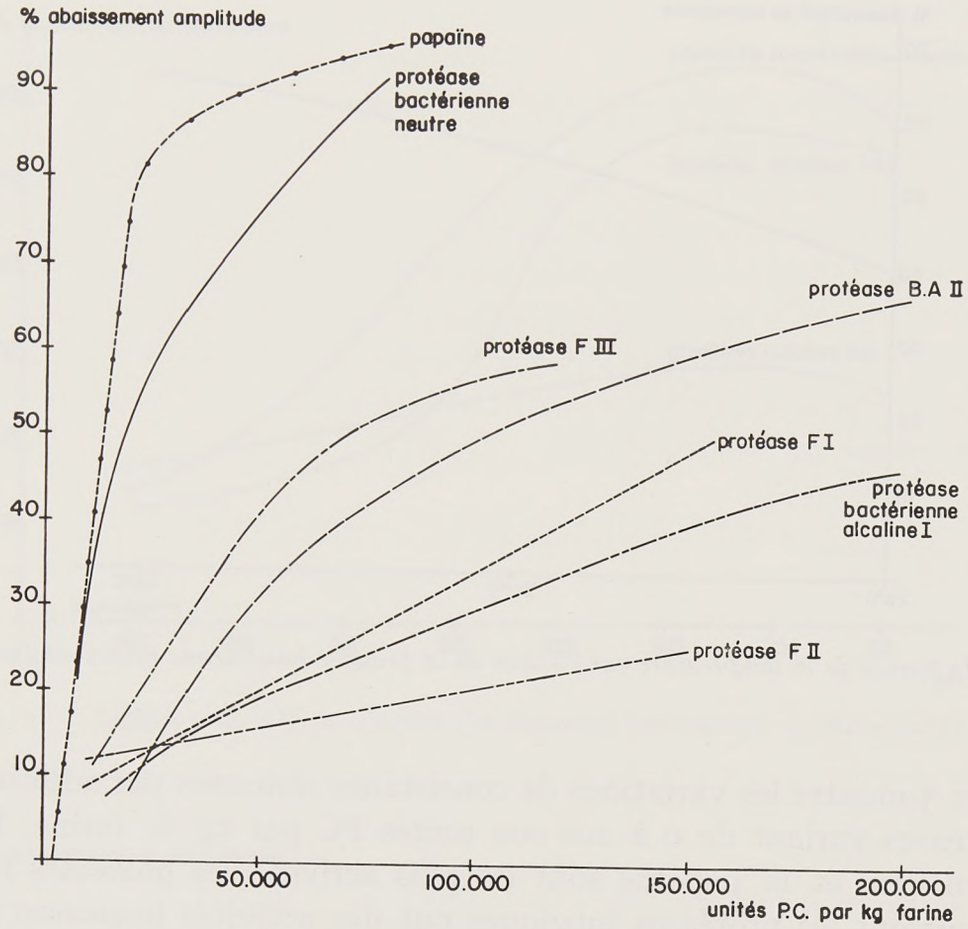


FIG. 6. — *Influence de la dose du protéase au farinographe*

La faible activité des protéases bactériennes alcalines nous a surpris ; en effet, notre expérience dans l'hydrolyse enzymatique de diverses protéines d'origine animale comme la caséine ou la viande, ou d'origine végétale comme le soja et le riz, nous a toujours amené à obtenir une hydrolyse plus complète avec les protéases alcalines comparativement à la protéase neutre. La spécificité des protéases alcalines est, en effet, beaucoup plus large ; la protéase bactérienne neutre n'hydrolyse pratiquement que les liaisons peptidiques dans lesquelles le groupe aminé appartient à un acide aminé hydrophobe comme l'alaline, la valine, l'isoleucine, la leucine et la phénylalanine. Sur les 29 liaisons peptidiques de la chaîne B de l'insuline, 11 sont coupées par la protéase neutre contre 19 pour la protéase alcaline. Il y a là, à notre avis, un point intéressant à éclaircir pour les chercheurs spécialisés dans l'étude du gluten.

Dans un autre domaine, il est intéressant de noter également l'influence de l'amylase bactérienne. L'addition de cette amylase à la pâte, à des doses qui sont en gros excès par rapport à son utilisation technologique, conduit à une diminution sensible de la consistance, l'amplitude restant constante (fig. 7). L'abaissement de consistance plafonne rapidement à 20 p. 100 environ avec une concentration en alpha-amylase de 5 000 unités ICC par kg de farine. Ce chiffre de 20 p. 100 avait d'ailleurs été obtenu par JOHNSON et MILLER en 1953. Nous avons vérifié que cet abaissement

n'était pas dû à une activité protéolytique ou bêta-glucanasique secondaires. Ce phénomène caractérise, à notre avis, une action sur un substrat se trouvant en quantité limitée, qui pourrait être l'amidon endommagé.

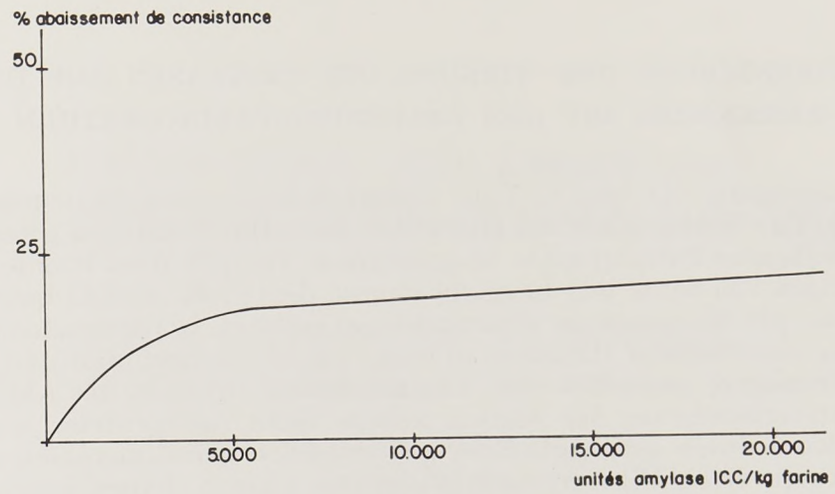


FIG. 7. — *Action de l'amylase bactérienne au farinographe*

CONCLUSIONS

Cette étude montre clairement la différence d'action des diverses protéases sur la viscosité et l'élasticité du gluten. Elle met en évidence, une fois de plus, la grande difficulté qu'il y aura à estimer les diverses protéases par des méthodes de dosage qui puissent donner une certaine corrélation avec l'action sur le gluten. Le praticien pourra retenir que la protéase bactérienne neutre et la papaïne sont les plus actives sur gluten et pourront être utilisées dans certaines fabrications biscuitières. Par contre, les protéases fongiques ont une action beaucoup plus légère qui peut rendre leur utilisation intéressante dans certains cas en panification.

SUMMARY

STUDY OF PROTEASES ACTION ON WHEAT FLOUR BY MEANS OF THE BRABENDER FARINOGRAPH

Following the tests undertaken by C. T. U., we tested several proteases according to their action on flour gluten under the conditions of a low hydration biscuit dough. Testing was carried out on a Brabender farinograph. The pH could be varied by mixing dry, with the flour, small amounts of acid or alkaline agents so as to obtain the desired pH after hydration. Under optimum pH conditions we estimated the action of various proteases in terms of the amount expressed in PC (caseinolytic power) units. No correlation is observed between the activity on casein and the diminution of the gluten's viscosity. For this titration we used partially purified enzymes. Under these conditions the *Bacillus subtilis* glucanases which may accompany the proteases of the last one did not show any appreciable action on the dough's viscosity. On the other hand, bacterial alpha-amylase, although used in excessive amounts for the correct baking of the dough, appreciably reduces the dough's viscosity. Under these conditions, only neutral bacterial protease has a strong action, comparable to the action of papain, on gluten. The fungic and alkaline bacterial proteases have a much more subdued action for all the conditions, especially pH and amount.

ZUSAMMENFASSUNG

UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG DER PROTEASEN AUF DAS WEIZENMEHL MIT DEM BRABENDER-FARINOGRAPHEN

Zur Vervollständigung der vom C. T. U. durchgeführten Versuche wurden mehrere Proteasen in bezug auf ihre Wirkung auf den Mehlkleber eines Hartkeksteiges getestet. Die Bestimmung wurde im Brabender-Farinographen vorgenommen. Der pH-Wert konnte variiert werden, indem geringe Mengen von Säure und Laugesubstanzen dem Mehl trocken beigemischt wurden, um den gewünschten pH-Wert nach der Hydratation zu erhalten. Bei optimalen pH-Bedingungen wurde die Wirkung verschiedener Proteasen in bezug auf Menge bestimmt und in PC Einheiten (Caseinolytische Vermögen) angegeben. Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität auf Casein und der Viskositätsverminderung des Klebers konnte nicht nachgewiesen werden. Für diese Bestimmung wurden teilweise gereinigte Enzyme verwendet. Die Glukanasen des *Bacillus subtilis*, die die Proteasen dieses Mikroorganismus'begleiten können, haben keinen nennenswerten Einfluss auf die Teigviskosität gezeigt. Im Gegensatz hierzu vermindert die bakterielle Alpha-Amylase die Teigviskosität sehr beträchtlich, wobei allerdings hinzuzufügen ist, dass die Amylase in zu grosser Dosis angewandt worden ist, um einen zufriedenstellenden Backversuch zu erhalten. Unter diesen Umständen übt einzig und allein die neutrale, bakterielle Protease eine starke Wirkung auf den Kleber aus, die mit der Papain wirkung verglichen werden Kann. Die alkalische Bakterien- und Pilzamylase haben eine wesentlich schwächere Wirkung bei allen Versuchsbedingungen, insbesondere was pH und Einsatzmenge betrifft.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Johnson J. A., Miller B. S., 1949. Studies on the role of alpha-amylase and proteinase in bread-making. *Cereal Chem.*, **26**, 371-383.

Johnson J. A., Miller B. S., 1953. The relationship between dough consistency and proteolytic activity. *Cereal Chem.*, **30**, 471-479.

Landis Q., 1935. An index of proteolytic activity by the use of the farinograph. *Cereal Chem.*, **12**, 25-33.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (2), 257-268.

UTILISATION DES PROTÉASES DANS LES INDUSTRIES DE CUISSON DES CÉRÉALES

J.-F. de la GUÉRIVIÈRE et G. BUSSIÈRE
avec la collaboration technique de J.-P. LEMÉTAYER et R. GÉRARD

Centre technique des Unions, C. T. U.,
1, rue Montgolfier,
75003 Paris

RÉSUMÉ

Une adjonction bien conduite de préparations commerciales de protéases à certaines fabrications biscuitières pauvres en matières grasses diminue ou même supprime les effets nuisibles engendrés par la rétraction des pâtes, phénomène étroitement lié à la présence d'un excès de protéines dans les farines de froment mises en œuvre. De la sorte, un technologue peut maîtriser les caractéristiques dimensionnelles des produits qu'il emballe. En outre, ces articles sont bien appréciés du dégustateur qui remarque leur friabilité, leur faible densité et leur présentation. A l'heure où l'industriel biscuitier éprouve des difficultés croissantes à se procurer des farines pauvres en protéines, l'utilisation d'enzymes protéolytiques paraît bénéfique. En panification fine, certaines formulations sont enrichies par des apports massifs de gluten vital pour conférer aux pains et aux produits dérivés un caractère diététique : si, au plan artisanal, l'incorporation de protéases permet d'obtenir des articles de qualité supérieure organoleptiquement à ceux fabriqués de manière classique, certains obstacles technologiques s'opposent à leur mise en œuvre dans des fabrications industrielles.

L'homme d'usine œuvrant dans les industries de cuisson des céréales doit concilier l'utilisation de matières premières fluctuantes de par leur origine biologique avec la production industrielle d'articles dont les caractéristiques dimensionnelles et organoleptiques se doivent d'être constantes. Au premier rang de ces matières premières se placent les farines de froment dont il est difficile de minimiser les différences d'aptitudes technologiques, compte tenu de la législation en vigueur en France. Les adjuvants couramment utilisés dans d'autres pays, tels les agents oxydants et réducteurs, sont interdits ici pour leur très grande majorité. Dès lors, on comprend mieux l'intérêt que suscitèrent l'autorisation du 31 juillet 1964 et sa parution au Journal officiel du 25 août de la même année qui permettaient la mise en œuvre en biscui-

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 69-01-575-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

terie de préparations commerciales de protéases. Il n'échappait pas aux industriels concernés que ces enzymes, en catalysant la rupture des liaisons peptidiques des chaînes protéiques constitutives du gluten, agiraient de la sorte sur le composant considéré comme la source principale des variabilités observables en fabrication.

Il faut rappeler en effet que la formation d'un réseau glutineux entraîne l'obtention de pâtes biscuitières difficiles à façonner du fait de leur forte rétraction et les articles correspondants sont durs et peu friables. C'est pourquoi des règles particulières président à la confection d'un biscuit sec.

Tout d'abord mettre en œuvre des farines à faibles teneurs protéiques et cette obligation se révèle d'années en années plus difficile à remplir dans le contexte français. En second lieu, limiter, autant que faire se peut, le gonflement des particules protéiques au cours du pétrissage : c'est la raison pour laquelle l'hydratation est réduite au minimum, d'autant que les matières sucrantes ajoutées dans les formules captent une partie de l'eau disponible pour la farine. Enfin, empêcher la formation d'un réseau glutineux en s'opposant au rassemblement des amas protéiques. On conçoit dès lors que le pétrissage en biscuiterie sèche ne consiste qu'en un mélange des ingrédients mis en présence pour réaliser une masse qui soit la plus homogène possible. On comprend également que les matières grasses introduites dans ces types de fabrication constituent à cet égard un précieux auxiliaire en formant écran entre les constituants protéiques.

De cette introduction découle l'intérêt de mettre en œuvre des protéases dans certaines fabrications. Mais leur utilisation rationnelle en biscuiterie française nécessitait une étude technologique approfondie car nos seules connaissances en France étaient dues aux rares travaux anglo-saxons publiés.

La protéase commerciale utilisée tout au long de ces travaux est d'origine bactérienne (*Bacillus subtilis*) et son activité sur substrat hémoglobine est chiffrée à 1,63 unité Anson, son pH optimum à 6,5 et sa température optimale voisine de 60°C.

Sachant que les matières grasses réduisent le rassemblement des protéines en biscuiterie sèche, il a paru logique pour les essais de fabrication de retenir une formulation pauvre en cette matière première de façon à mieux apprécier l'action des protéases.

Cette composition inclut donc 8 p. 100 de matières grasses et 30 p. 100 de saccharose par rapport à la farine mise en œuvre. Après pétrissage et un temps de repos de 18 heures, la pâte est laminée et les pâtons découpés à l'aide d'un emporte-pièce carré de 6 cm de côté. Entre le dernier laminage et le découpage, il s'écoule 30 secondes, temps qui permet à la pâte de se rétracter. Il en résulte que plus la rétraction de la pâte est importante (facteur défavorable), plus l'épaisseur de la pâte est forte et, par voie de conséquence, plus les poids des pâtons sont élevés. Ainsi l'évaluation du poids des pâtons constitue un véritable indice de rétraction des pâtes.

Ensuite la cuisson est effectuée à 280°C durant des temps tels que les pertes pondérales soient les mêmes dans tous les essais et amènent le biscuit à une humidité résiduelle de 3 p. 100. Sur le produit fini proche des articles du type « casse-croûte » du commerce, les critères suivants sont évalués :

— « largeur » du biscuit, définie comme étant la mesure du côté du produit subissant la plus forte rétraction ;

— densité des biscuits ;

— caractéristiques organoleptiques appréciées par un jury de dégustation qui note la couleur, l'état de surface, la texture, la friabilité et la flaveur. Ces appréciations sont complétées par la mesure de la force résistante opposée par le biscuit à la pénétration d'un cône d'ouverture de 15°C (pénétrométrie).

Il a été tout d'abord étudié l'influence de l'adjonction de doses croissantes de protéases (de 100 à 1 500 p.p.m.) et ce, pour un même temps de repos de 18 heures. On constate (fig. 1) que la rétraction des pâtes est maximale dans le cas de l'essai témoin pour lequel les pâtons les plus lourds ont été obtenus. Dès la dose 100 p.p.m., l'apport des protéases se traduit par une forte diminution du phénomène de rétraction. Les poids des pâtons sont réduits de 12 p. 100 pour 300 p.p.m. L'évolution de la rétractabilité est de type logarithmique (bas de la fig. 1). Ainsi une loi classique en enzymologie est ici retrouvée en dépit de la complexité du milieu, à savoir que l'activité de la protéase est proportionnelle au logarithme de sa concentration.

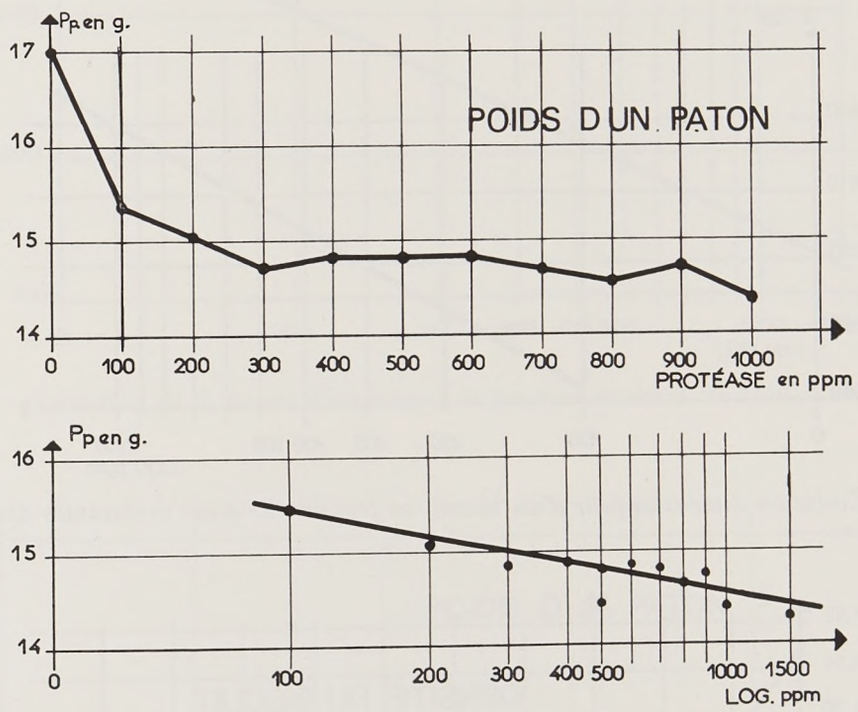


FIG. 1. — *Évolution du poids des pâtons en fonction des doses croissantes des protéases*

Durant la première phase du processus de cuisson, les phénomènes de rétraction se poursuivent et s'opposent à l'étalement des produits, lui-même engendré par leur diminution de consistance à des températures voisines de 60°C. La figure 2 montre que la rétraction mesurée sur le produit fini est également la plus importante pour l'essai témoin et une adjonction de 300 p.p.m. de protéases rend égaux les effets antagonistes dus à la rétraction et à l'étalement. Ainsi l'article possède les dimensions exactes de celles imprimées par l'emporte-pièce au découpage, c'est-à-dire 6 cm.

La densité du produit (fig. 3) diminue avec l'importance de l'apport de protéases puisqu'elle chute de 17,5 p. 100 pour 600 p.p.m. par exemple.

Également, la dureté (fig. 4) appréciée par pénétrométrie est maximale pour l'essai ne comportant pas d'enzyme.

Le jury de dégustation accorde la meilleure note aux articles fabriqués avec

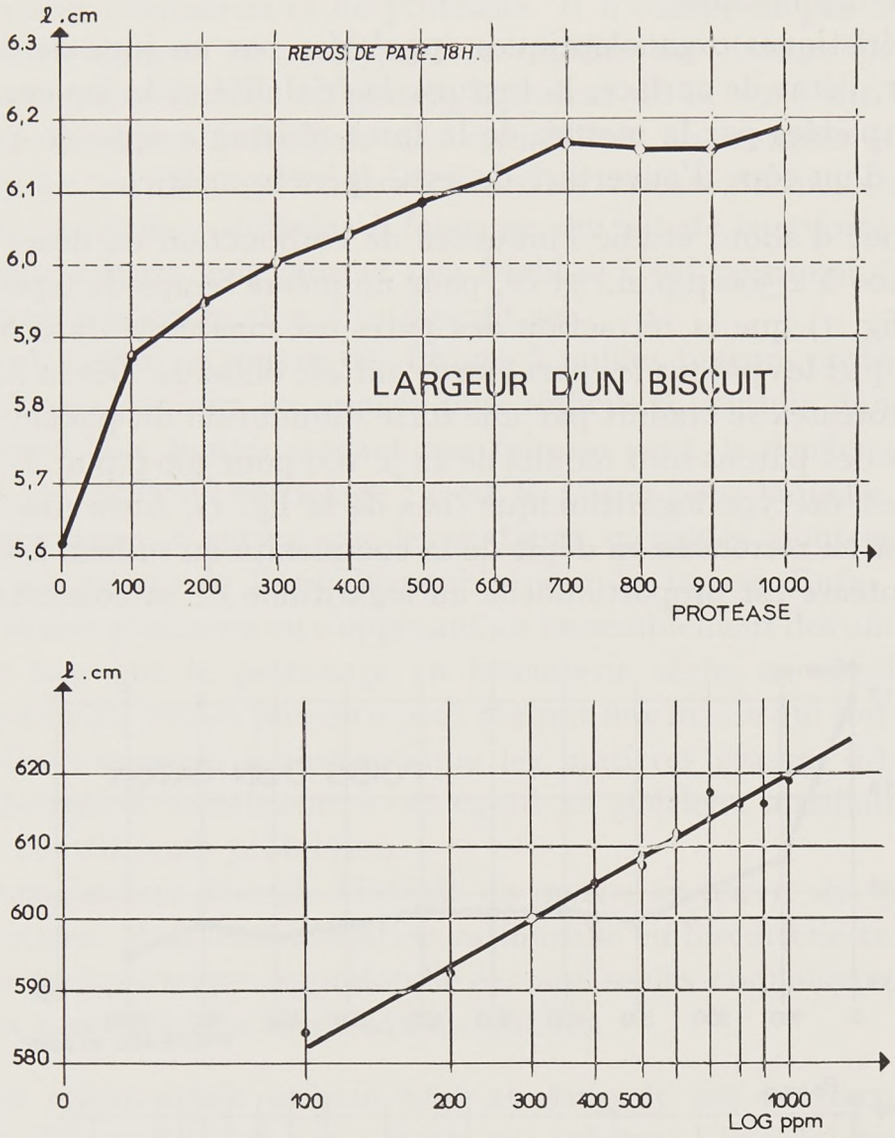


FIG. 2. — *Évolution dimensionnelle d'un biscuit en fonction de doses croissantes des protéases*

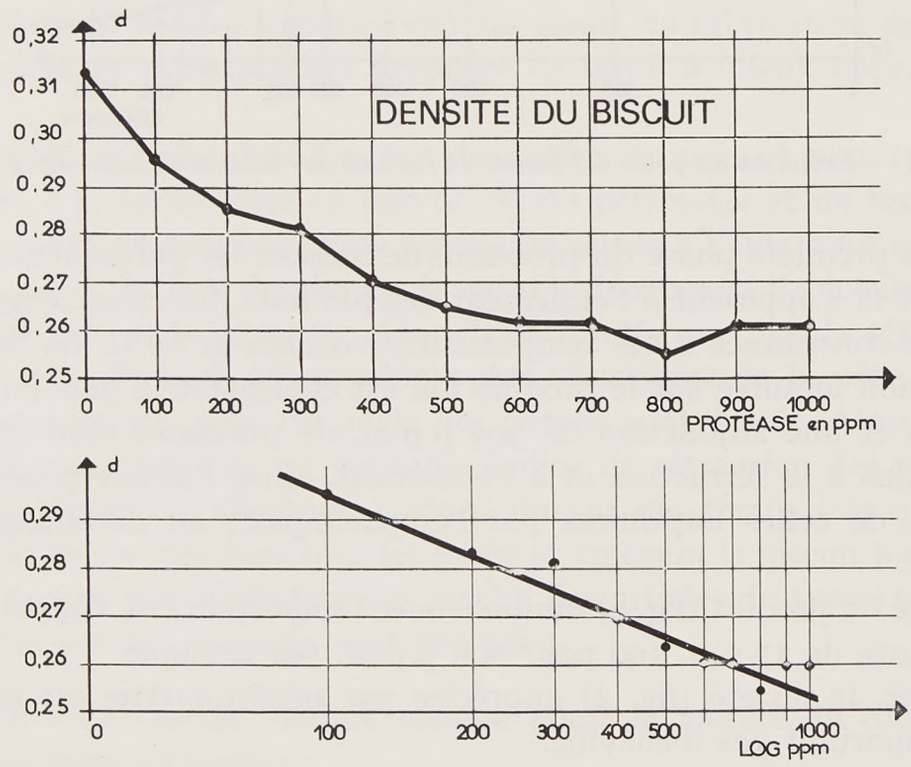


FIG. 3. — *Évolution de la densité d'un biscuit en fonction de doses croissantes des protéases*

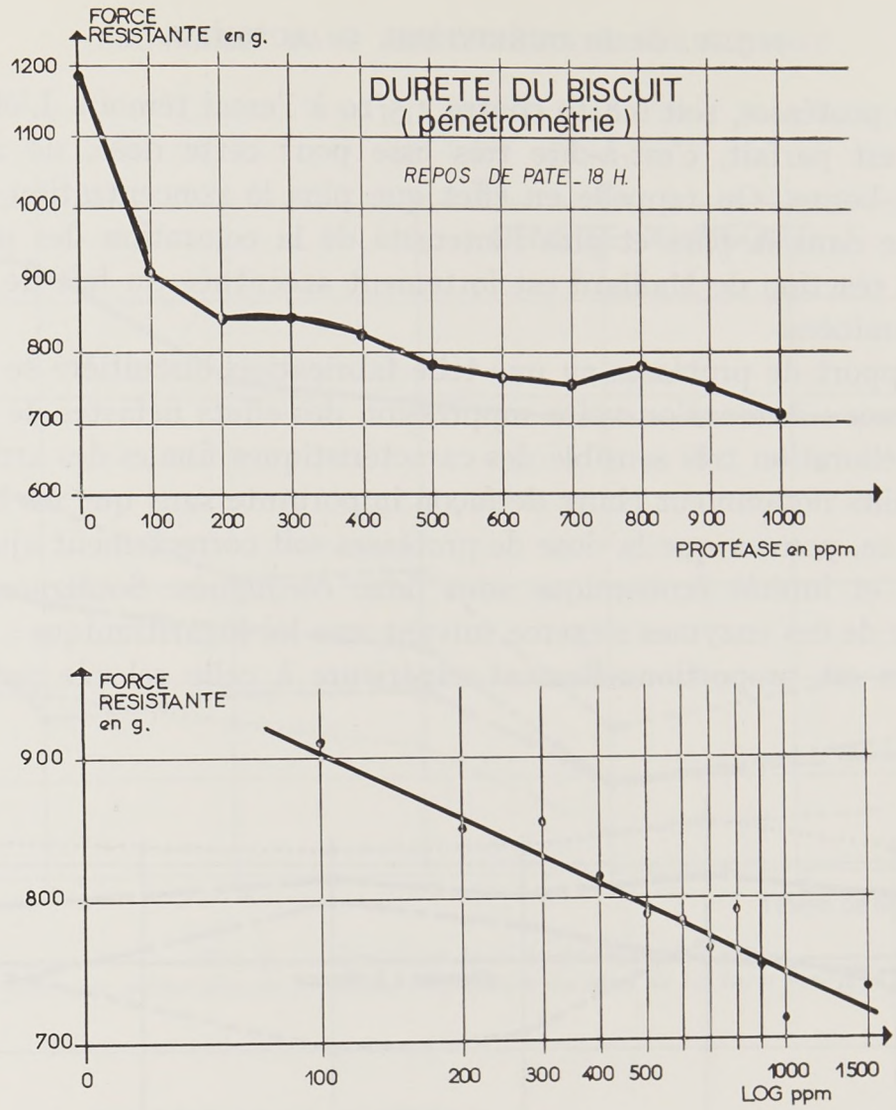


FIG. 4. — *Évolution de la dureté d'un biscuit en fonction de doses croissantes des protéases*

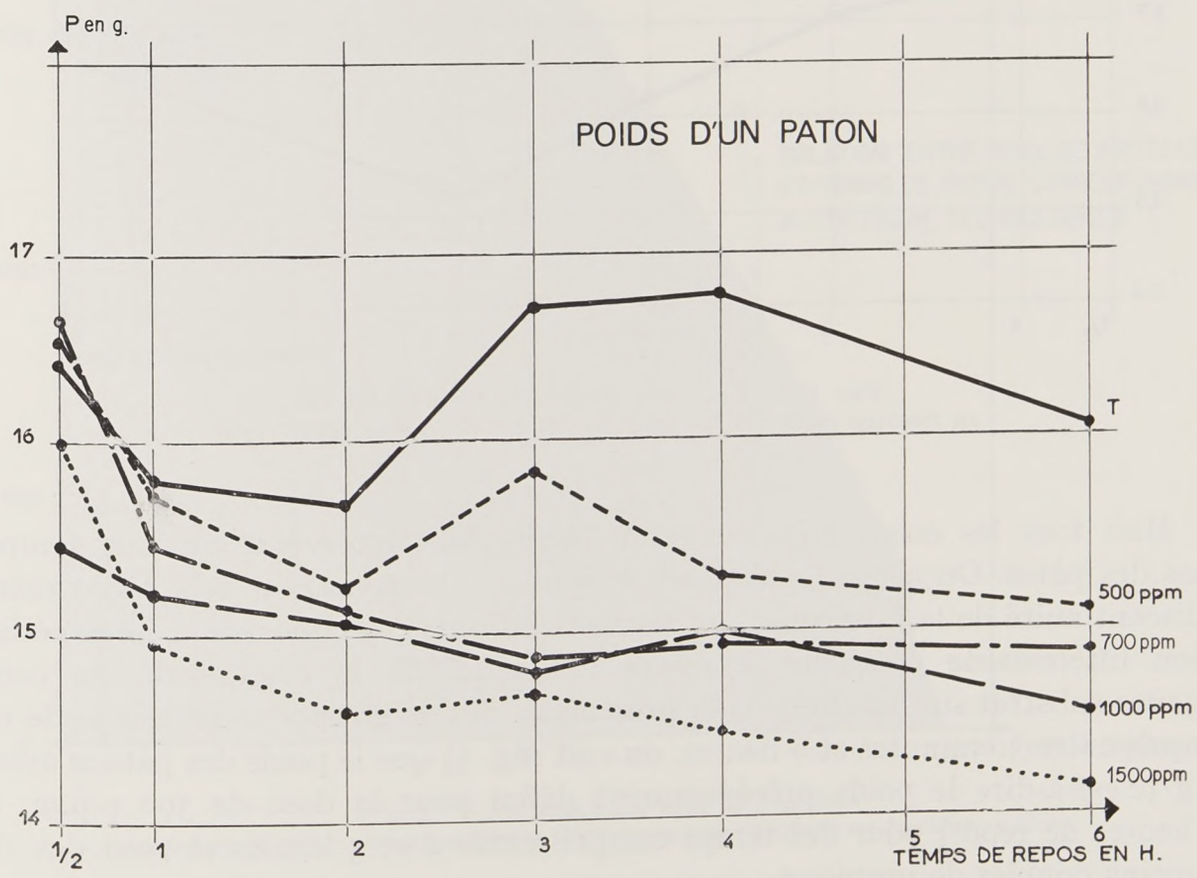


FIG. 5. — *Évolution du poids des pâtons en fonction du temps de repos des pâtes et de la dose des protéases*

300 p.p.m. de protéases, soit 6,8/10 contre 4,5/10 à l'essai témoin. L'état de surface des produits est parfait, c'est-à-dire très lisse pour cette dose, de même que la coloration est bonne. On rappelle en effet que plus la concentration en protéases est importante dans la pâte et plus l'intensité de la coloration des produits cuits augmente : la réaction de Maillard est fortement accentuée du fait de la libération de fonctions aminées.

Ainsi, l'apport de protéases en une telle fabrication biscuitière se révèle singulièrement efficace : diminution voire suppression des effets néfastes de la rétraction des pâtes, amélioration très sensible des caractéristiques finales des articles. La densité des produits notamment chute de façon importante sans que les biscuits ne se fragilisent, et ce, pourvu que la dose de protéases soit correctement ajustée. Intérêt technologique et intérêt économique sont donc conjugués. Soulignons également que l'influence de ces enzymes s'exerce suivant une loi logarithmique : leur activité à faibles doses est proportionnellement supérieure à celle relevée pour les fortes doses.

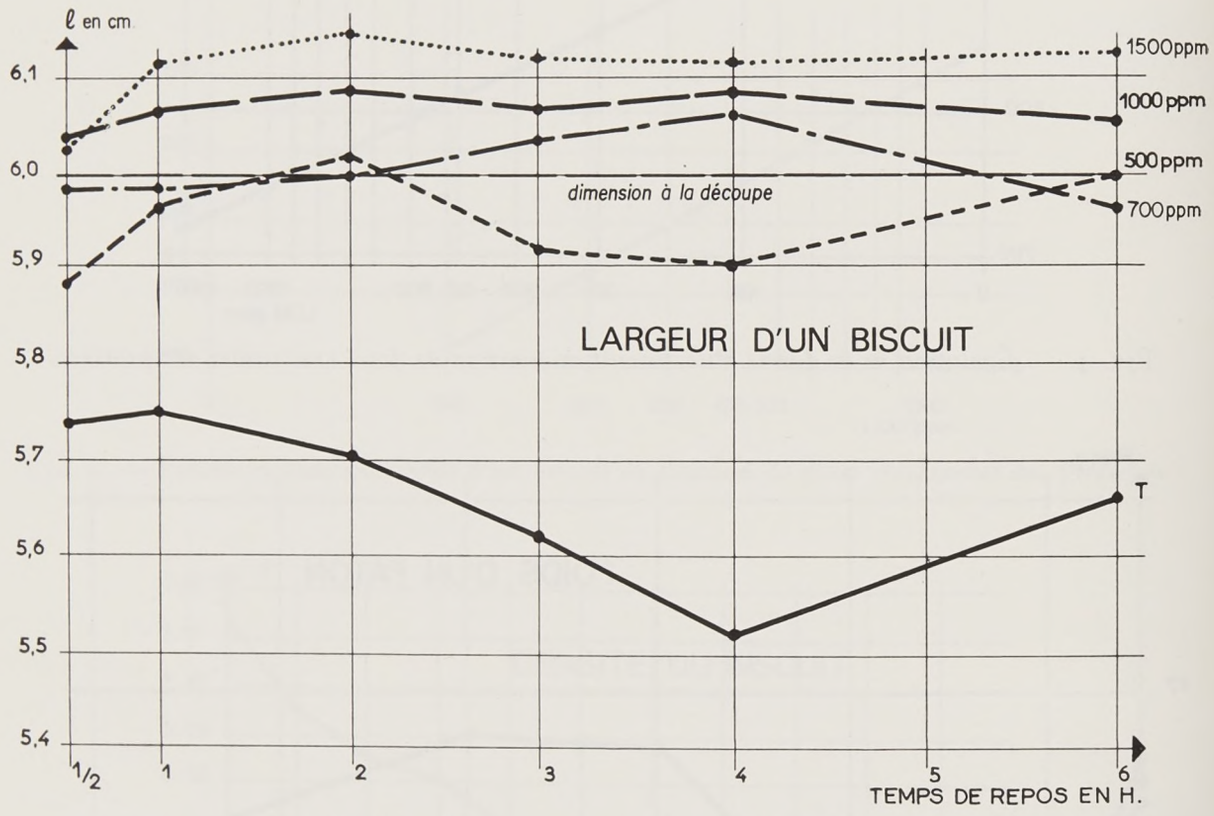


FIG. 6. — *Évolution dimensionnelle d'un biscuit en fonction du temps de repos des pâtes et de la dose des protéases*

Mais tous les essais précédemment décrits font intervenir un long temps de repos des pâtes. On conçoit qu'industriellement l'observance de tels délais entraîne la discontinuité de la fabrication et des installations d'entreposage. Une expérimentation intéressante consistait à suivre l'influence de la diminution du contact enzymes-substrat sur les effets de la protéolyse. Si l'on considère des temps de repos compris entre 30 minutes et 6 heures, on voit (fig. 5) que le poids des pâtons avoisine 15 g (c'est-à-dire le poids précédemment défini pour la dose de 300 p.p.m. avec 18 heures de repos) pour des temps compris entre 2 et 3 heures et pour des doses au moins doubles de protéases.

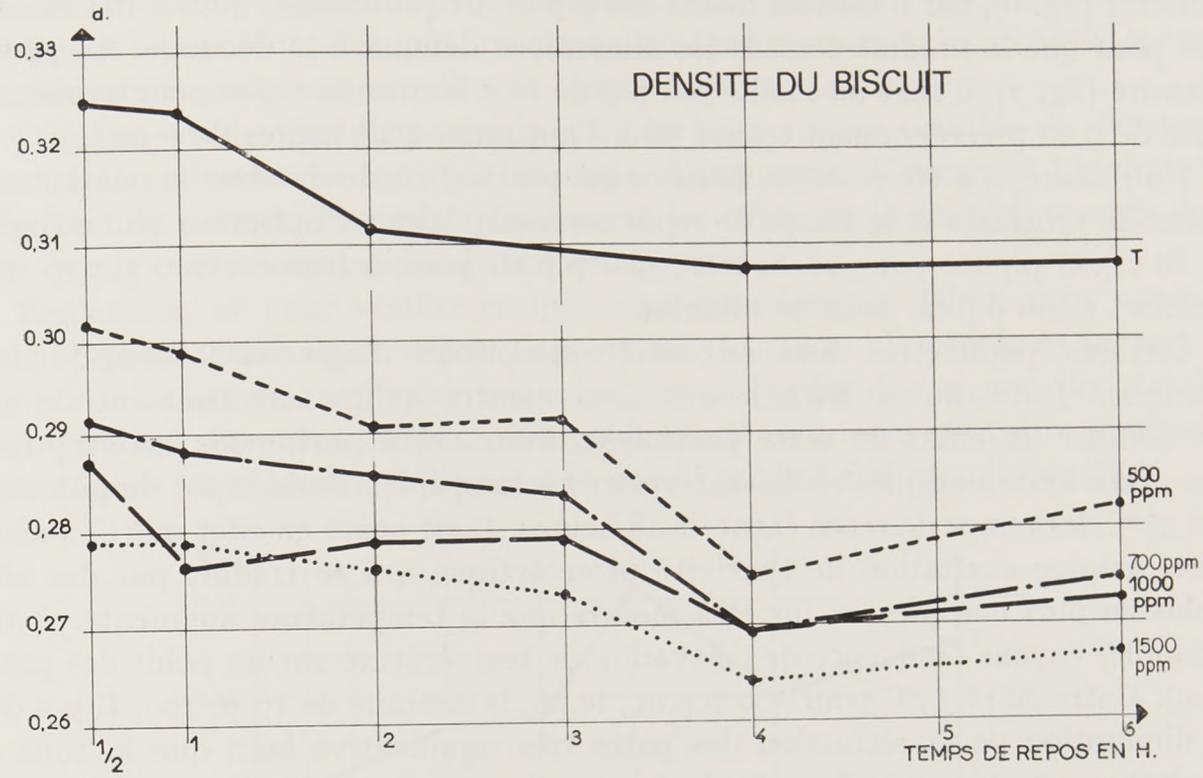


FIG. 7. — *Évolution de la densité d'un biscuit pour une même dose de protéases en fonction du taux de sel incorporé à la pâte*

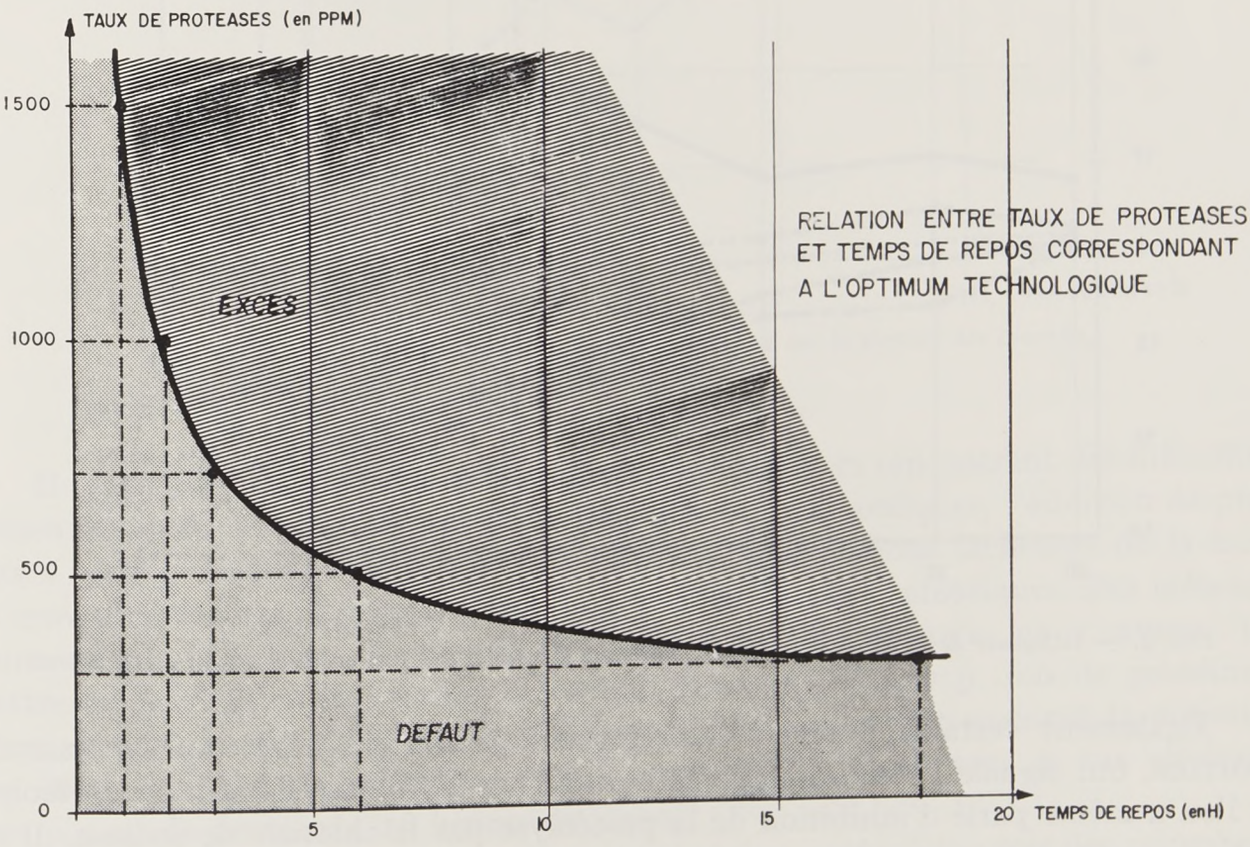


FIG. 8. — *Relation entre taux de protéases et temps de repos correspondant à l'optimum technologique en biscuiterie sèche*

Des constatations analogues s'imposent si l'on considère le facteur rétraction du biscuit (fig. 6), car il faut au moins 500 p.p.m. de protéases et plus d'une heure de repos pour que le produit possède les dimensions définies à la découpe. Au plan de la densité (fig. 7), il faut au moins 700 p.p.m. et 2 heures de repos pour avoisiner le chiffre de 0,28 précédemment trouvé pour l'optimum à 18 heures de repos.

En résumé, il a été possible, dans ce cas particulier, de montrer la relation entre le taux de protéases et le temps de repos correspondant à l'optimum technologique (fig. 8) : 300 p.p.m. pour 18 heures ; 500 p.p.m. pour 6 heures ; 700 p.p.m. pour 2 heures ; 1 500 p.p.m. pour 30 minutes.

Certains paramètres sont en outre susceptibles d'agir sur l'intensité de la protéolyse. JOHNSON et MILLER ont ainsi montré qu'un accroissement de 10°C peut doubler les effets de cette protéolyse. Pour notre part, nous avons procédé à des essais systématiques en faisant varier les températures de repos de pâte entre 20 et 33°C, les temps de repos étant de 18 heures. Il est exact en effet que l'on assiste à une certaine exaltation de l'activité protéolytique qui se traduit par des effets de plus en plus marqués au fur et à mesure que la température augmente. A titre d'exemple, voyons l'influence de l'élévation de température sur les poids des pâtons (fig. 9). Entre 20 et 33°C pour 300 p.p.m., le poids diminue de 16 p. 100. Il y a donc une diminution de la rétraction des pâtes très significative bien que la zone des températures testée soit éloignée de la température optimale d'action de la protéase telle que celle-ci a été définie sur substrat hémoglobine.

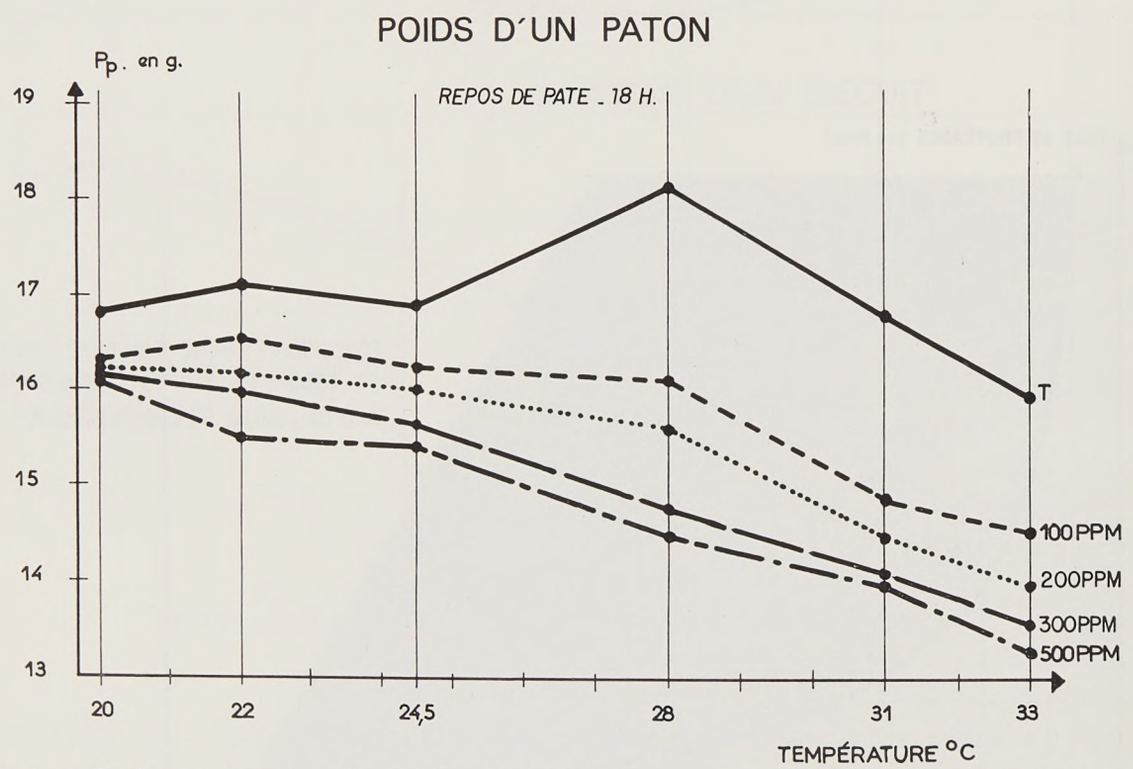


FIG. 9. — *Influence de la température de préparation des pâtes sur l'efficacité d'action des protéases*

Également certains auteurs, tels MILLER, JOHNSON, BERZINA, KOVALENKO, ROITIER, ont signalé l'action antagoniste du sel vis-à-vis des effets de la protéolyse et l'on a même parlé d'inhibition de la protéolyse par le chlorure de sodium. Il est vrai que nous avons nous-mêmes noté par exemple sur le facteur densité (fig. 10) que l'absence de sel permettait la production des biscuits les moins denses. Mais en tout état de cause, en raison des faibles quantités de sel habituellement introduites

dans les formulations de biscuiterie sèche sucrée (en moyenne 1,5 p. 100), l'action antagoniste de cet ingrédient reste modeste. Par contre, en biscuiterie salée, des précautions s'imposent, soit que l'on procède à l'incorporation du sel après le temps de repos retenu, soit encore qu'il soit ajouté à l'entrée au four.

D'autres études complémentaires qu'il ne nous est pas possible de développer ici ont été conduites. Le fait, par exemple, d'augmenter légèrement l'hydratation de la formule permet d'accroître faiblement les effets de la protéolyse, sans doute parce que le contact enzymes-substrat est favorisé.

Également, et pour vérifier ce que nous énoncions au début, nous avons pu voir que, pour 18 heures de repos, l'apport de 300 p.p.m. de protéases permet une réduction du taux de saccharose mis en œuvre de l'ordre de 5 p. 100 (fig. 11) dans le cas envisagé. De même le pourcentage de matières grasses peut être diminué de 2 p. 100 dans les mêmes conditions sans que le produit fini en soit pénalisé.

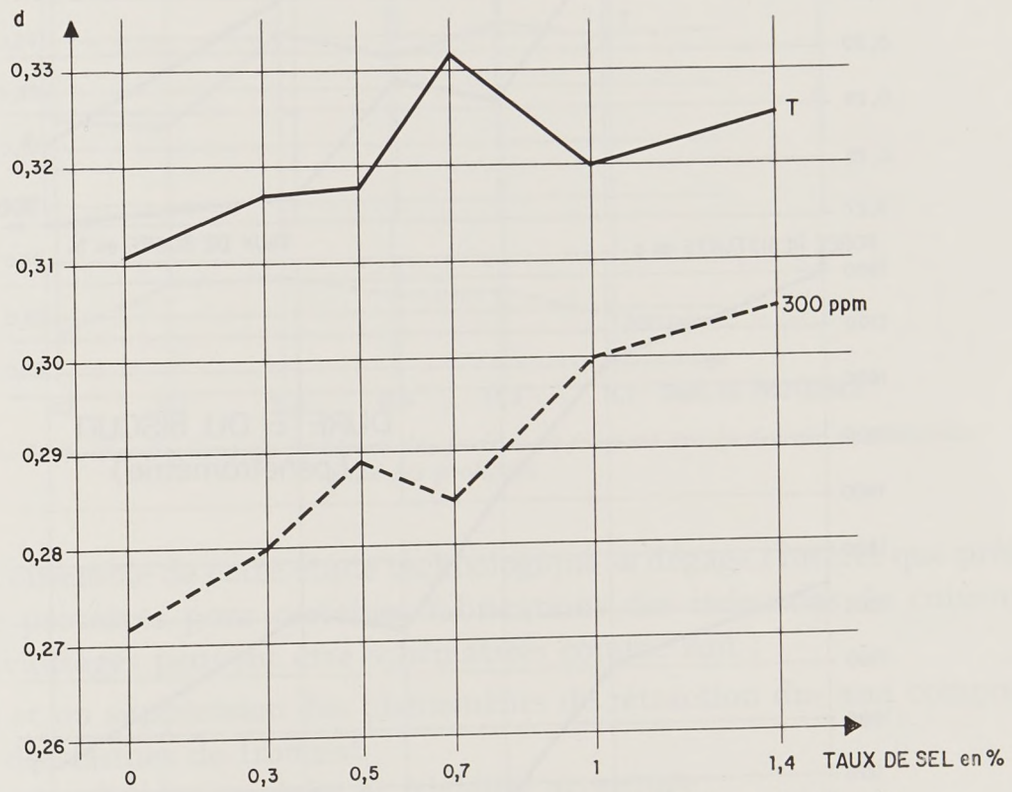


FIG. 10. — *Influence du taux de chlorure de sodium sur la densité des biscuits. Rôle des protéases*

Il faut enfin indiquer que si les industriels biscuitiers rencontrent des difficultés croissantes pour se procurer des farines à faibles taux protéiques, l'addition de protéases permet de lutter efficacement contre les répercussions fâcheuses de la mise en œuvre de farines de froment trop chargées en matières protéiques. Par mélange d'une farine de base avec une fraction fine turboséparée nous avons pu mettre en fabrication des farines contenant entre 9,7 et 11,7 p. 100 de protéines. Nous avons pu vérifier (fig. 12) que l'on pouvait annuler pratiquement la majorité des effets dus à l'accroissement de 2 p. 100 de protéines dans le cas envisagé (300 p.p.m. de protéases, 18 heures de repos).

Ainsi cette étude effectuée en biscuiterie sèche sucrée doit avoir des retombées pour la fabrication d'autres articles. Mise à part la confection de produits très friables du type « crackers » dont la technologie nous vient d'Outre-Atlantique, il

est hors de doute que des applications découlent des présents travaux. Nous avons pu récemment constater par exemple que l'incorporation de protéases en fabrication de feuilletages permettait de raccourcir considérablement les temps de repos de pâte et la durée de fabrication.

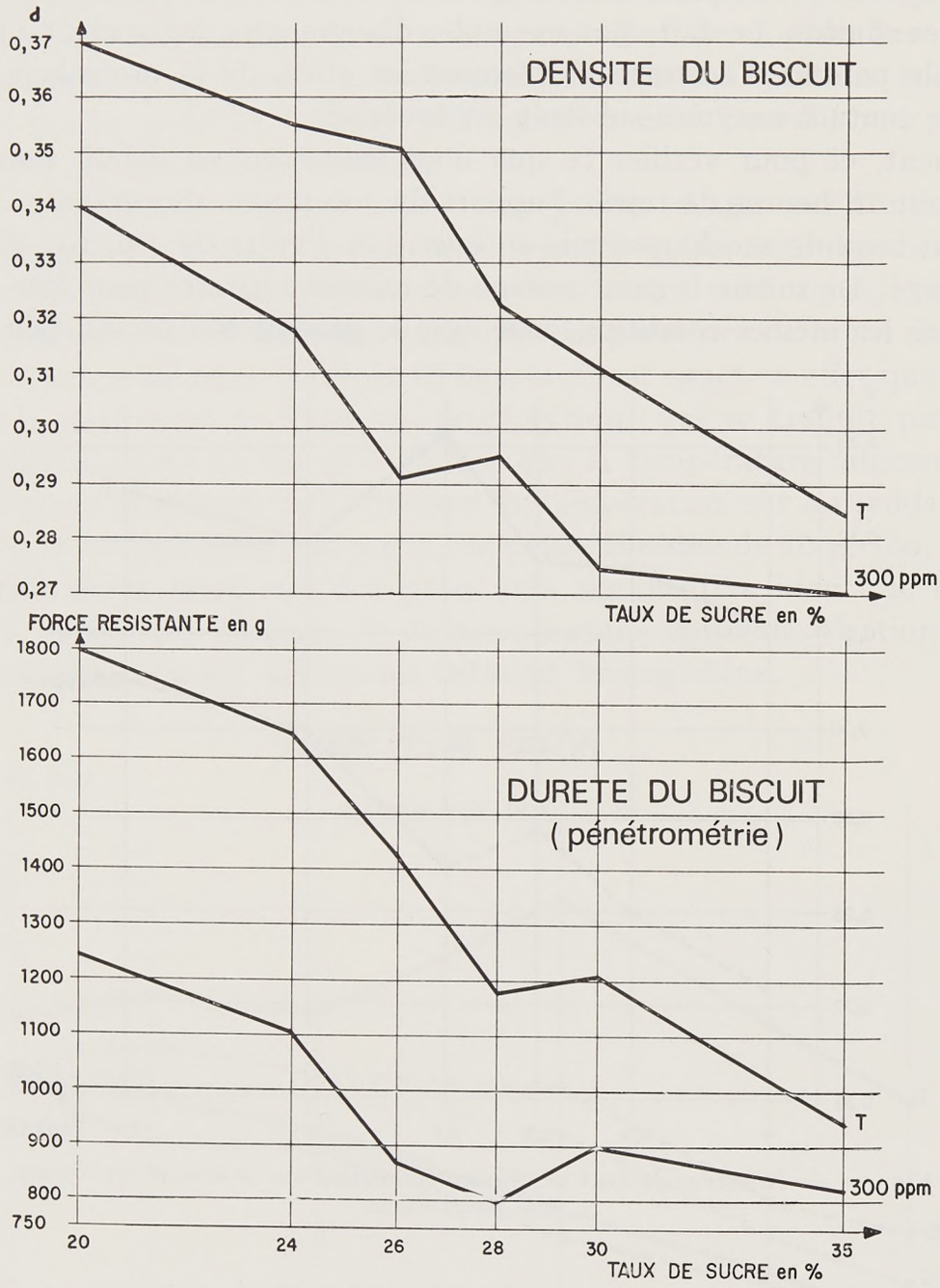


FIG. 11. — *Influence du taux de saccharose sur la densité et la dureté des biscuits. Rôle des protéases*

Cependant, il nous faut indiquer que des incompatibilités avec les impératifs de la production industrielle sont apparues lors de certains essais, notamment dans le domaine de la panification fine. En effet, la réalisation de biscottes ou de pains ayant de faibles teneurs en glucides et destinés à des régimes est effectuée le plus couramment par des incorporations massives de gluten vital. Or les pâtes riches en ce composant se travaillent très difficilement, compte tenu de leur forte élasticité. En outre, les produits finis sont peu appréciés du consommateur. Nous avons donc procédé à des prémélanges gluten-protéases qui étaient mis à reposer durant des temps courts — inférieurs à deux heures. Si la dose d'enzymes est correctement

ajustée, il est vrai que cette façon de procéder permet l'obtention d'articles aux caractéristiques organoleptiques incontestablement très supérieures à ceux rencontrés dans le commerce. Cependant, les pâtes qui donnent les meilleurs produits, notamment au plan de leur texture, sont celles qui présentent une bonne plasticité mais aussi un caractère collant marqué peu compatible avec les exigences d'un laminage industriel. Également, les temps de fabrication doivent être strictement observés, faute de quoi, la rupture des chaînes protéiques du gluten devient trop importante et le réseau incapable de retenir convenablement les gaz de la fermentation. Cette méthode est donc peu satisfaisante dans l'état actuel de nos travaux et pour la protéase testée.

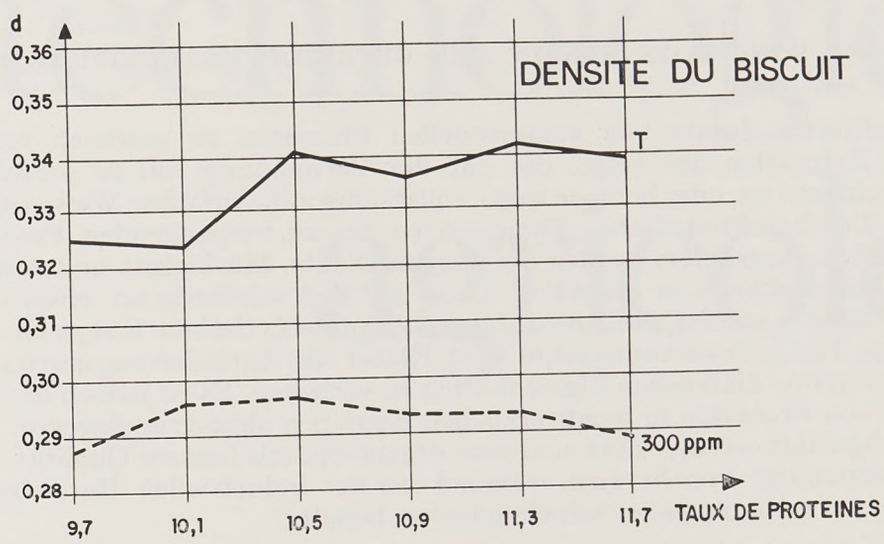


FIG. 12. — *Influence du taux de protéines des farines de froment sur la densité des biscuits. Rôle des protéases*

Ainsi, de l'ensemble de cette étude technologique se dégage l'intérêt que présente l'utilisation de protéases pour certaines fabrications des industries de cuisson des céréales. Ces avantages peuvent être schématisés comme suit :

— diminution et/ou suppression des phénomènes de rétraction dus aux composants protéiques des farines de froment ;
— baisse de la densité des produits et friabilité accentuée ;
— amélioration de leur présentation ;
— possibilité d'emploi de farines peu adaptées à certaines utilisations industrielles.

Ainsi sont précisées les modalités d'action des protéases dans des milieux aussi complexes que les pâtes de farine de froment. Ce travail ouvre la voie à des innovations et en conséquence à la diversification des produits à base de céréales.

SUMMARY

THE USE OF PROTEASES IN THE CEREAL BAKING INDUSTRIES

A well conducted addition of commercial protease preparations to certain biscuit products with a low fat content reduces or removes the harmful effects caused by retraction of the doughs, a phenomenon closely linked to the presence of excess protein in the wheat flour used. In this

way, technologists can control the dimensional characteristics of the products they pack. Furthermore, these articles are held in high repute by the taster who notes their friability, low density and presentation. At a time when the biscuit manufacturer is finding it increasingly difficult to obtain flours with a low protein content, the use of proteolytic enzymes seems advantageous. In fine panification, some formulations are enriched by massive additions of vital gluten to give the breads and by-products a dietetic character : if on the small scale, the incorporation of proteases permits articles to be obtained that are of superior organoleptic quality to those manufactured in the traditional way, certain technological obstacles obstruct the use of proteases industrially.

ZUSAMMENFASSUNG

ANWENDUNG VON PROTEASEN IN DER GETREIDEVERARBEITUNGSINDUSTRIE

Ein gut geführter Zusatz von kommerziellen Proteasen zu gewissen fettarmen Keksen vermindert die Retraktion der Teige, die auf die Verwendung von zu proteineichen Weizenmehlen zurückzuführen ist, oder hebt sie sogar vollständig auf. Auf diese Weise ist es dem Technologen möglich, die charakteristischen Dimensionen des zu verpackenden Produktes beeinflussend zu beherrschen. Ausserdem werden die geringe Dichte, Mürbigkeit und Aufmachung dieser Produkte vom Verbraucher sehr geschätzt. Da es zur Zeit schwierig ist, eiweissarme Mehle auf dem Markt zu finden, scheint die Anwendung von proteolytischen Enzymen von Nutzen zu sein. Für gewisse Feinbackwarenprodukte wird Kleber als Anreicherungsmittel verwendet, um dem Produkt bestimmte diätetische Eigenschaften zu verleihen. Es ist jedoch darauf hinzuweizen, dass der Zusatz von Proteasen in handwerklichen Betrieben ohne grundlegende Schwierigkeiten mit Erfolg durchgeführt werden kann und eine organoleptisch bessere Qualität im Vergleich zu der üblichen Herstellung erreicht wird, während bei der industriellen Herstellung die Anwendung von Proteasen technologische Schwierigkeiten bereitet.

annales de technologie agricole

Trimestriel

1974

Vol. 23 . N° 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Enzymes et industries de cuisson à base de céréales

2e PARTIE

Colloque tenu à Paris les 6 et 7 novembre 1972

LIPASES ET LIPOXYGÉNASES

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 273-286.

LA LIPASE DU BLÉ. CARACTÉRISTIQUES DE SON ACTION EN MILIEUX AQUEUX ET PEU HYDRATÉ (1)

J.-M. CAILLAT et R. DRAPRON

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert, 91305 Massy

---

RÉSUMÉ

En milieu aqueux, les caractéristiques d'action de la lipase sont voisines de celles des lipases microbiennes et des tissus animaux. L'étude cinétique de la réaction *in vitro* a permis de montrer, en particulier, que les ions Ca^{++} sont indispensables et que les sels biliaires sont nécessaires pour avoir une lipolyse optimale.

En milieu peu hydraté, essentiellement hétérogène, la réaction suit les lois classiques de la cinétique enzymatique. Contrairement à la plupart des autres hydrolases, la lipolyse se manifeste pour des activités de l'eau très faibles et varie de manière sensiblement proportionnelle avec l'activité de l'eau, sauf aux fortes humidités, où avec l'apparition d'eau solvante on observe une inhibition partielle, d'autant plus importante que la température est élevée. Comme en milieu aqueux, ce sont les liaisons esters 1 et 3 des triglycérides qui sont hydrolysées préférentiellement.

INTRODUCTION

Parmi les enzymes intervenant dans la dégradation des constituants biologiques, la lipase pose un problème d'une grande importance pratique et économique. En effet, son action conduit essentiellement à des altérations qui se traduisent globalement par l'apparition d'acides gras, responsables en grande partie de l'acidification des produits au cours de leur conservation ; par ailleurs, des effets plus

(1) Travail recouvrant en partie la thèse de Docteur-Ingénieur présentée à la Faculté des Sciences de Paris par J.-M. Caillat. N° C. N. R. S. : 4061.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-135-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

discrets, dus à l'interaction entre les produits de dégradation des triglycérides et les autres constituants du milieu, peuvent se manifester en modifiant certains caractères technologiques.

Dans le cas des céréales et de leurs dérivés, bien que la teneur en lipides soit faible, l'action de la lipase demeure très importante puisque l'apparition d'une faible quantité d'acides gras suffit à modifier notablement la valeur de ces produits. De plus, la libération d'acides gras insaturés conduit inévitablement à un rancissement oxydatif, soit spontané, soit enzymatique, ces phénomènes étant beaucoup plus rapides avec les acides libres qu'avec leurs esters.

Il nous est donc apparu important de tenter l'isolement de l'enzyme afin d'en étudier les caractéristiques d'action en milieu aqueux et surtout en milieu sec, compte tenu du fait que la majeure partie des transformations des produits céréaliers s'effectue à l'état solide ou pâteux peu hydraté.

Il est difficile de définir les pH et température optimaux d'action de la lipase pour des raisons qui seraient trop longues à développer ici et nous avons porté notre attention tout spécialement sur l'effet activateur des sels biliaires et des ions calcium, effet très caractéristique qui a été montré dans le cas de la lipase pancréatique et de celle de micro-organismes.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Il n'a pas été possible, pour l'étude des caractéristiques de l'action de la lipase du blé, d'utiliser cette enzyme à l'état pur. Présente en faible quantité dans le grain de blé sain, elle se trouve concentrée dans les parties périphériques, à l'état insoluble dans les solutions salines, acides ou basiques. Comme l'un de nous l'a déjà montré, l'activité lipolytique augmente considérablement au cours de la germination et elle se trouve presque entièrement localisée dans le coléoptile (Drapron *et al.*, 1969). A partir de celui-ci, nous avons obtenu, à la suite de divers fractionnements, un extrait concentré en lipase, laquelle reste vraisemblablement liée à un organite cellulaire duquel nous n'avons pas pu la dissocier (Caillat, 1970). C'est à partir de cette fraction que nous l'avons étudiée en milieu hydraté.

La méthode de mesure de l'activité lipolytique mise en œuvre est celle décrite par Desnuelle (1955). Son principe repose sur la détermination des acides gras libérés à pH 9 et 37°C, à partir d'une émulsion d'huile d'olive, stabilisée soit par la gomme arabique, soit par l'alcool polyvinylique en présence d'ions calcium et de sels biliaires.

Pour l'étude de la lipolyse en milieu peu hydraté, nous avons utilisé du son de blé finement broyé. En effet, le coléoptile, trop riche en activité lipolytique, ne permet pas une étude en fonction de l'hydratation, car la lipolyse est plus rapide que la mise en équilibre hydrique du milieu.

Au son, préalablement délipidé, on incorpore de l'huile d'olive et le mélange est placé à température constante à différentes humidités relatives. Les acides gras libérés au bout d'un temps déterminé sont isolés par chromatographie sur couche mince, estérifiés et enfin dosés par chromatographie en phase gazeuse en présence d'un étalon interne (Drapron et Sclafani, 1969).

CARACTÉRISTIQUES D'ACTION EN MILIEU AQUEUX

Influence des sels biliaires

La figure 1 traduit l'activation de la lipolyse en fonction de la concentration en sels biliaires, en utilisant une émulsion stabilisée, soit par la gomme arabique, soit par l'alcool polyvinylique, en présence d'ions Ca^{++} à concentration optimale.

Avec l'émulsion dans la gomme arabique, on observe une faible activité lipolytique qui, à partir d'un seuil de concentration en sels biliaires, s'accroît puis passe par un maximum, décroît ensuite et semble tendre vers un palier (courbe 1).

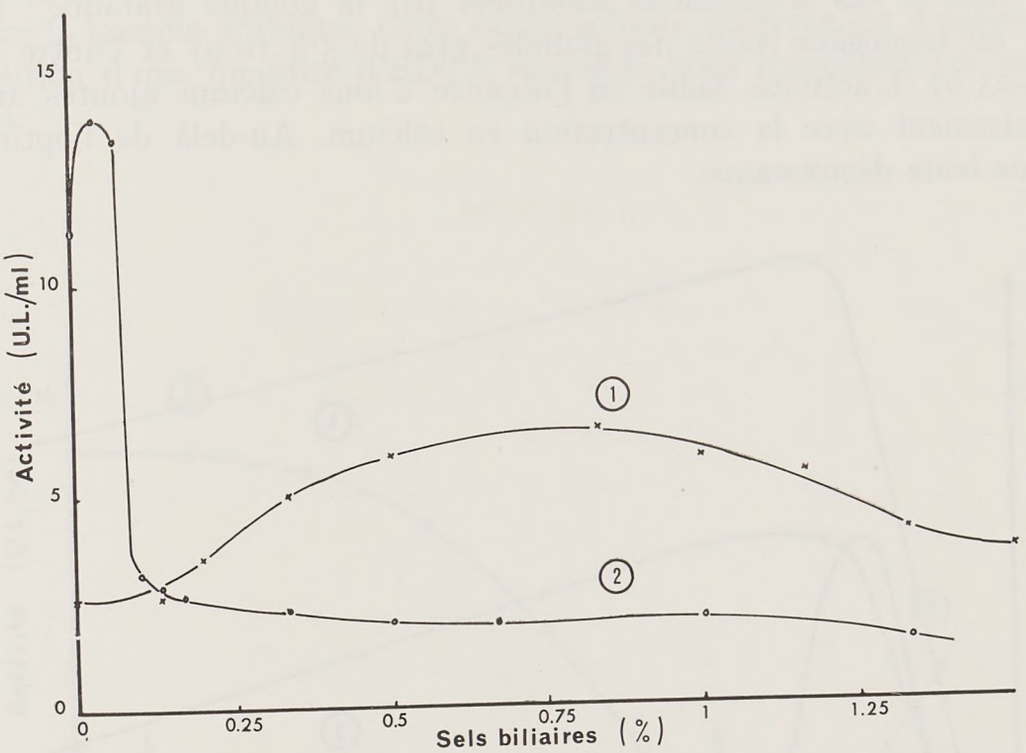


FIG. 1. — *Influence de la concentration en sels biliaires sur la vitesse de lipolyse*
Courbe 1 : Émulsion stabilisée par la gomme arabique
Courbe 2 : Émulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique

En utilisant l'émulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique, l'allure du phénomène est sensiblement la même ; cependant on observe un optimum d'activité pour une concentration en sels biliaires beaucoup plus faible que dans le cas précédent (courbe 2).

Ainsi, aux faibles concentrations, les sels biliaires possèdent une action activatrice, alors qu'à des concentrations élevées ils semblent exercer un rôle inhibiteur, fait qui avait déjà été constaté dans le cas de la lipase du pancréas (ANSTED et HANSEN, 1968) et du soja (PERL et DIAMANT, 1963). Cette inhibition apparente pourrait être due à une diminution de l'aire interfaciale résultant de la rupture de l'émulsion, rupture qui est d'ailleurs particulièrement nette dans le cas de l'émulsion à base d'alcool polyvinylique, dès que l'optimum d'activité est dépassé.

La différence de comportement des deux émulsions doit être vraisemblablement attribuée à la nature physico-chimique de l'interface. La stabilité plus grande des émulsions dans la gomme arabique vis-à-vis des sels biliaires pourrait résulter de la présence de charges électriques portées par les groupes carboxyles ionisés des acides uroniques.

De nouvelles expériences restent à entreprendre pour mieux comprendre les fonctions apparemment complexes que jouent les sels biliaires au cours de la lipolyse.

Influence des ions calcium

Le rôle des ions calcium (fig. 2) a été tout particulièrement examiné. Nous avons suivi, à concentration optimale en sels biliaires, l'évolution de l'activité lipolytique en fonction de la concentration en ions calcium. Les courbes 1 et 2 sont obtenues dans le cas d'émulsions stabilisées par la gomme arabique ; l'une des émulsions est homogène (taille des globules gras de 5 à 10 μ) et l'autre est hétérogène (5-25 μ). L'activité, faible en l'absence d'ions calcium ajoutés au milieu, croît linéairement avec la concentration en calcium. Au-delà de l'optimum, on observe une lente décroissance.

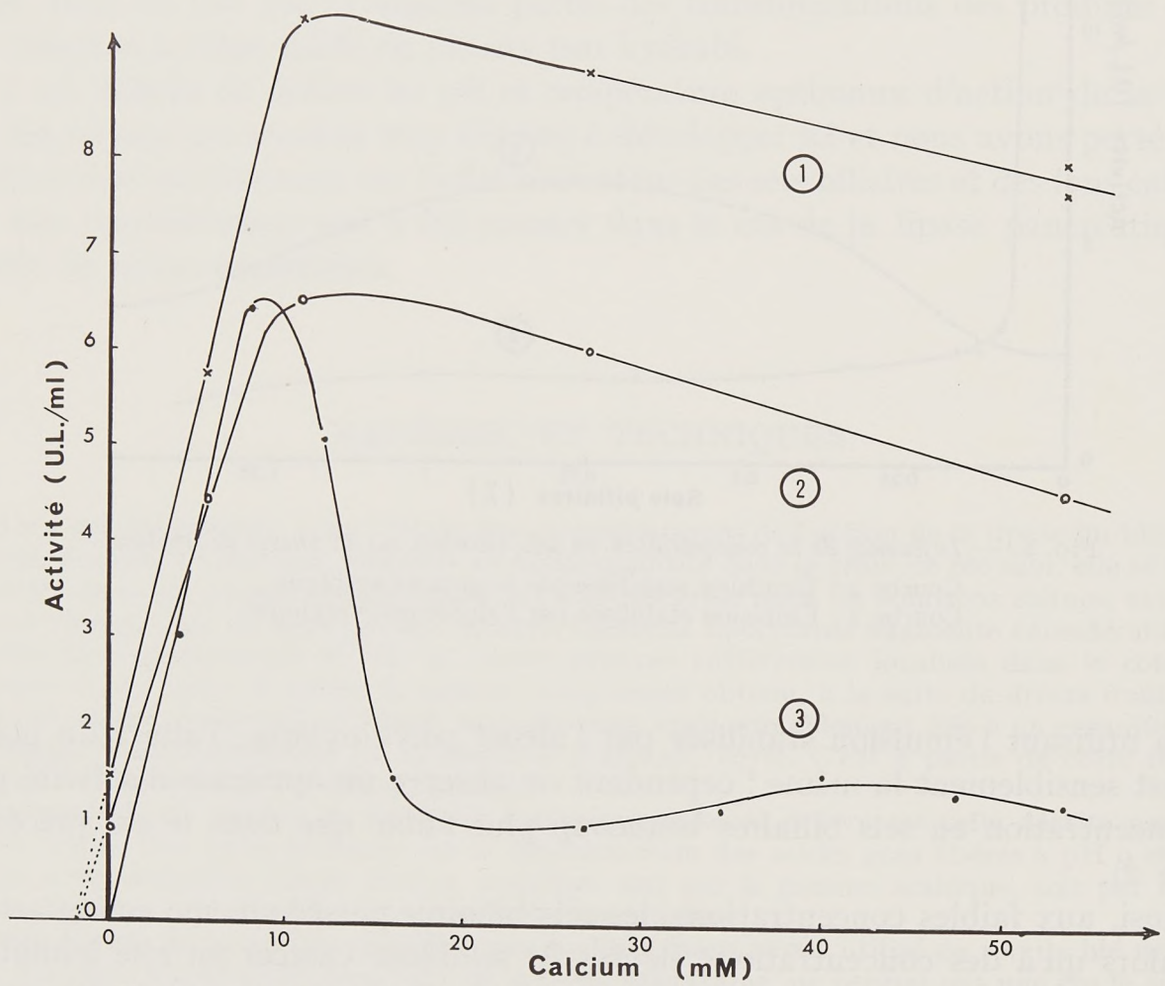


FIG. 2. — *Influence de la concentration en ions Ca^{++} sur la vitesse de lipolyse*
Courbe 1 : Émulsion « homogène » dans la gomme arabique (taille des globules gras : 5-10 μ)
Courbe 2 : Émulsion « hétérogène » dans la gomme arabique (taille des globules gras : 5-25 μ)
Courbe 3 : Émulsion dans l'alcool polyvinylique (taille des globules gras : 1-2 μ)

Dans le cas de l'émulsion stabilisée par l'alcool polyvinylique, l'activité, nulle en l'absence d'ions calcium, atteint très vite une valeur maximale et décroît ensuite rapidement pour des concentrations croissantes d'ions calcium (courbe 3) ; au-delà de l'optimum, on observe une rupture très nette de l'émulsion attribuée à une force ionique trop élevée.

Si l'on remplace les ions calcium par les ions magnésium, strontium et baryum, l'allure du phénomène est inchangée.

Il apparaît ainsi que les ions calcium, et autres alcalino-terreux, sont indispensables à la réaction. En effet, la manifestation d'une faible activité dans le cas d'émulsions stabilisées par la gomme arabique doit être attribuée à la présence de calcium préexistant dans ce produit. On remarque que les droites représentant le début de l'évolution de l'activité, extrapolées à activité nulle (courbes 1 et 2), coupent l'axe des concentrations en un même point qui correspond à la quantité de calcium présente dans la gomme arabique. Cette faible activité observée est d'ailleurs annulée par l'addition d'une quantité d'EDTA suffisante pour complexer ces ions (fig. 3, courbe 1).

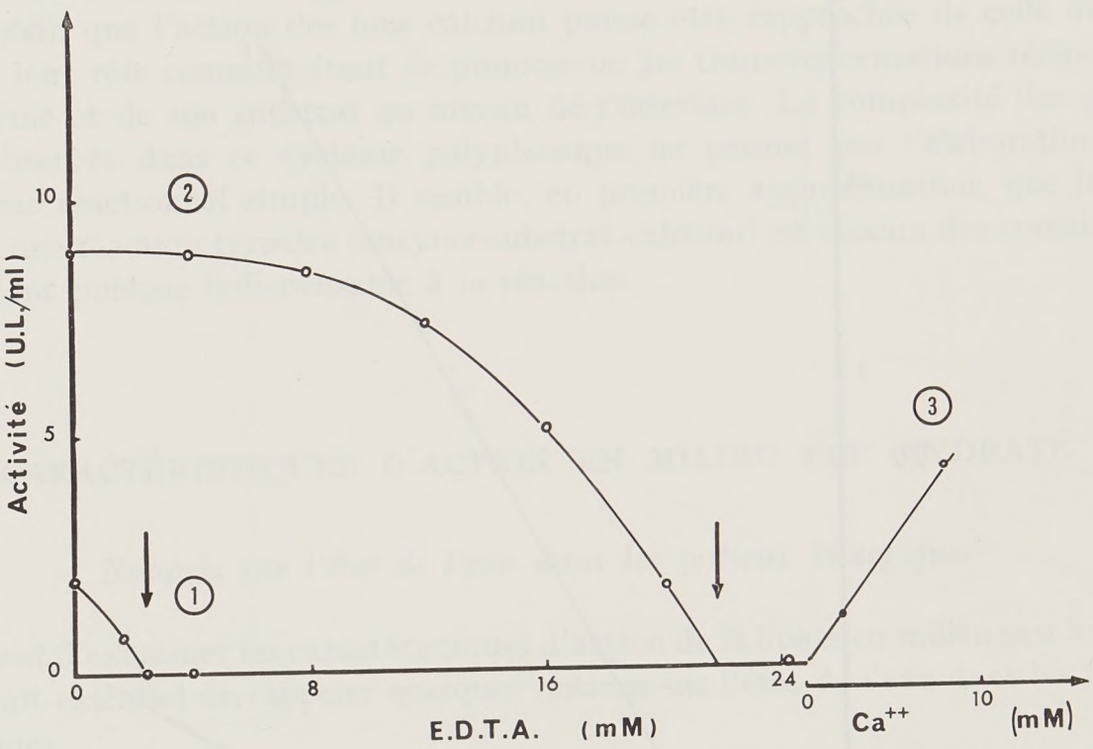


Fig. 3. — *Influence de la concentration d'E. D. T. A. sur la vitesse de lipolyse*
Courbe 1 : Inhibition sans Ca^{++} ajouté
Courbe 2 : Inhibition avec Ca^{++} ajouté
Courbe 3 : Réactivation par un excès de Ca^{++}

En présence de calcium ajouté (courbe 2), l'inhibition se manifeste pour une concentration supérieure d'EDTA, correspondant à la complexation de la totalité du calcium. Cet agent complexant respecte l'intégrité de l'enzyme, puisqu'un nouvel excès d'ions calcium régénère l'activité (courbe 3).

Afin de préciser le rôle de ces ions, nous avons déterminé, toutes choses égales par ailleurs, l'influence de la « quantité de substrat » pour des concentrations variables de calcium. Les courbes de Michaelis ainsi obtenues traduisent l'allure du phénomène et leurs transformations, selon Lineweaver et Burk, permettent d'obtenir les valeurs des paramètres cinétiques Vm et Km (fig. 4).

On constate que Vm est pratiquement indépendant de la concentration en ions calcium alors que Km est inversement proportionnel à cette concentration. Cette observation est en excellent accord avec celles d'autres auteurs ayant étudié les lipases d'origine animale ou microbienne (Ota et Yamada, 1966 ; Benzonana, 1968). Ceci montre que les ions calcium sont sélectivement fixés par l'enzyme dans

la phase primaire de la réaction, ce qui confirme les expressions cinétiques données par ces auteurs :

$$E + Co \underset{\leftarrow}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} Eco^*$$

$$Eco^* + S \underset{\rightarrow}{\overset{K_2}{\rightleftharpoons}} (ECoS) \xrightarrow{kcat.} Produits$$

où E désigne l'enzyme, Co le cofacteur et S le substrat ; K_1 et K_2 sont des constantes d'équilibre, kcat. une constante de vitesse.

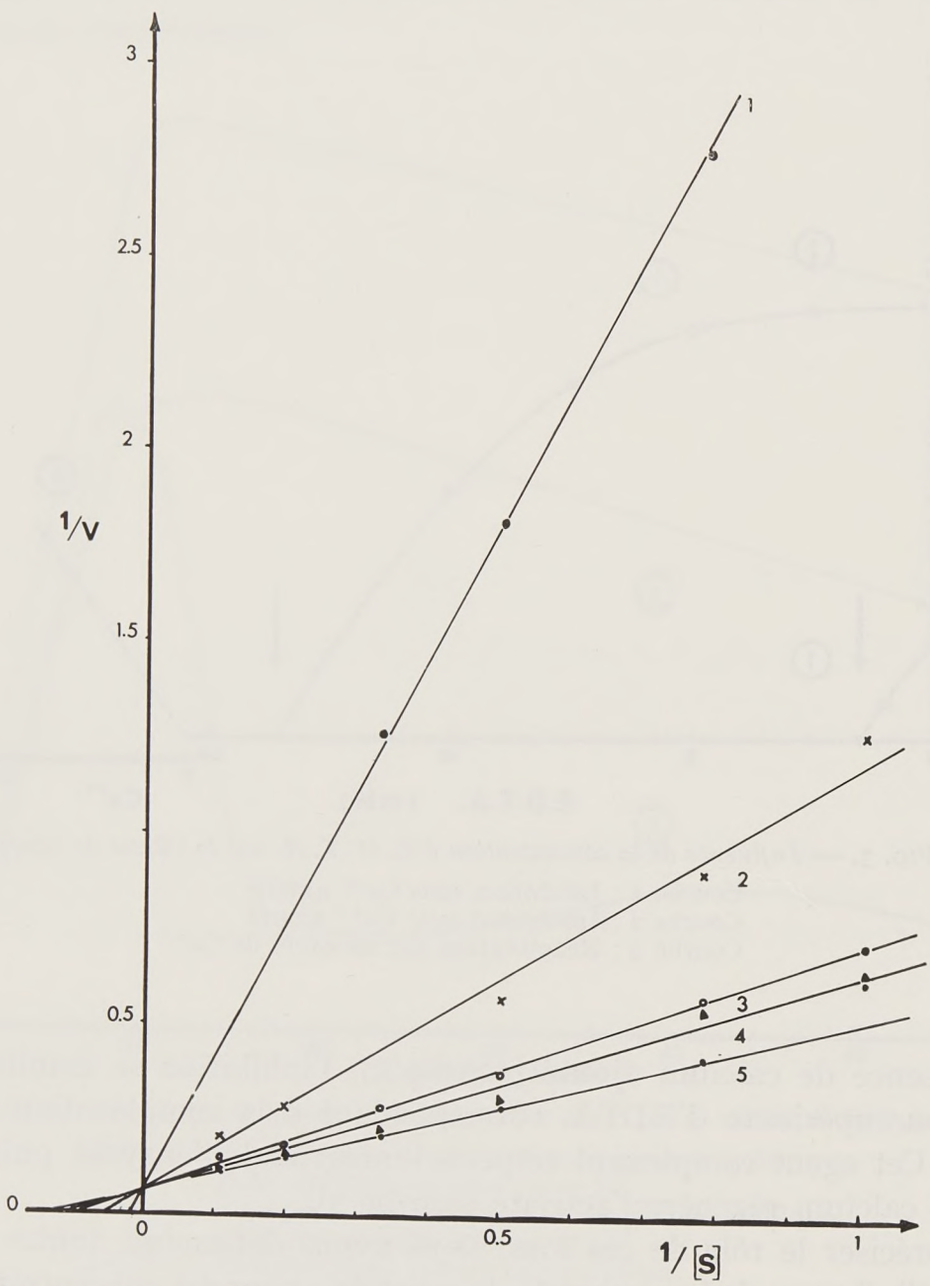


Fig. 4. — *Représentation, selon* Lineweaver et Burk, *des courbes de Michaelis obtenues pour diverses concentrations en ions* Ca^{++}

Courbe 1 : Sans Ca^{++} ajouté
Courbe 2 : 4 mM en Ca^{++}
Courbe 3 : 8 mM en Ca^{++}
Courbe 4 : 12 mM en Ca^{++}
Courbe 5 : 16 mM en Ca^{++}

Bien que notre expérimentation ait été moins approfondie dans le cas de l'action des autres alcalino-terreux, il y a tout lieu de penser que ceux-ci ont un rôle identique.

En dehors de ce rôle de cofacteur, les ions calcium interviennent également de façon très importante au cours de la lipolyse *in vitro* en débarrassant l'interface eau/lipide des acides gras libérés, par formation de savons insolubles dans l'eau et solubles dans les globules lipidiques. Un grand excès de ces ions est même nécessaire pour déplacer efficacement l'équilibre et obtenir une lipolyse optimale. C'est ce que résument les deux équilibres suivants :

$$\text{Enzyme} + Ca^{++} \rightleftharpoons \text{complexe actif}$$

$$\text{Acides gras} + Ca^{++} \rightleftharpoons \text{sels de calcium insolubles dans l'eau.}$$

Il semble, comme le suggèrent divers auteurs (Ota et Yamada, 1966 ; Benzonana, 1968), que l'action des ions calcium puisse être rapprochée de celle des sels biliaires, leur rôle commun étant de promouvoir les transconformations réciproques de l'enzyme et de son substrat au niveau de l'interface. La complexité des phénomènes observés dans ce système polyphasique ne permet pas l'élaboration d'un mécanisme réactionnel simple. Il semble, en première approximation, que la lipolyse soit une réaction ternaire (enzyme-substrat-calcium) où chacun des constituants est limitant puisque indispensable à la réaction.

CARACTÉRISTIQUES D'ACTION EN MILIEU PEU HYDRATÉ

Rappels sur l'état de l'eau dans les milieux biologiques

Avant d'examiner les caractéristiques d'action de la lipase en milieu peu hydraté, il apparaît essentiel de rappeler quelques notions sur l'état de l'eau dans les milieux biologiques.

Dans les milieux solides peu hydratés, la plupart des phénomènes biophysicochimiques sont affectés, non par l'hydratation globale, mais bien par l'état de disponibilité de cette eau. « L'activité de l'eau », prise au sens thermodynamique du terme, joue un rôle important dans ce processus. Or l'activité de l'eau peut être reliée à l'humidité relative avec laquelle le milieu est en équilibre ; cette humidité relative est définie, pour une température donnée, par le rapport (p/po) de la pression de vapeur (p) en équilibre avec le milieu à la pression de vapeur d'eau saturante (po).

Il est classique de relier la teneur en eau d'un produit biologique à l'humidité avec laquelle celui-ci est en équilibre. L'isotherme de sorption ainsi obtenue (fig. 5) caractérise l'affinité pour l'eau d'un produit, un corps sec ayant par définition une activité de l'eau nulle et l'eau libre une activité de 1, correspondant à 100 p. 100 d'humidité relative.

La forme sigmoïde de l'isotherme de sorption traduit le recouvrement de plusieurs phénomènes élémentaires et l'on a coutume de distinguer trois régions :

— une région correspondant à une adsorption d'eau sur les sites fortement polaires, par liaison hydrogène ;

— une seconde région où les molécules forment des couches additionnelles plus faiblement retenues ;

— une troisième régisn, à partir du moment où la courbe s'écarte de la tangente au point d'inflexion, correspondant à l'eau dite « solvante », puisque retenue par des forces très faibles, de nature capillaire ou osmotique.

A partir de ce schéma, il est ainsi plus facile de comprendre l'évolution de la lipolyse dans de tels milieux.

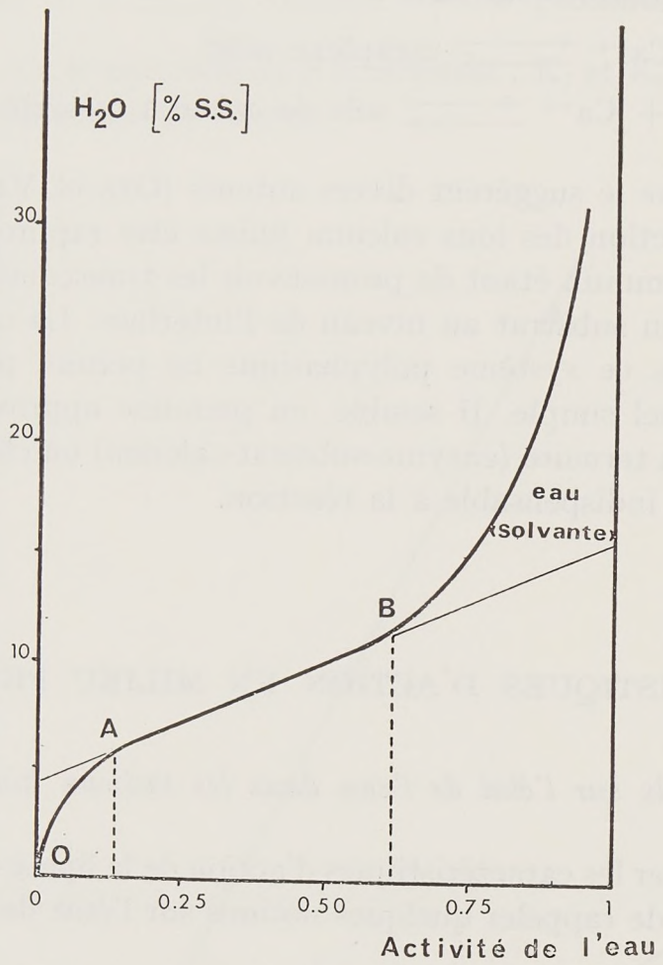


FIG. 5. — *Représentation schématique d'une courbe de sorption*

L'activité de l'eau est caractérisée par l'humidité relative du système en équilibre, l'eau libre ayant, par définition, un coefficient d'activité égal à 1, équivalent à 100 p. 100 d'humidité relative (HR).

$$HR = \frac{p}{po} = \frac{\text{pression de vapeur d'eau en équilibre avec le produit}}{\text{pression de vapeur d'eau saturante}}$$

ASPECTS CINÉTIQUES DE LA RÉACTION LIPOLYTIQUE

Bien que la lipolyse se développe dans un milieu pulvérulent, pauvre en eau, nous avons pu montrer que la réaction obéit à la loi de Michaelis et que l'affinité de l'enzyme pour son substrat est très voisine de celle observée en milieu aqueux.

A 30°C, pour une humidité relative de 80 p. 100, la quantité d'acides gras libérés au bout de 72 h, en fonction de la concentration en substrat, augmente rapidement tout d'abord jusqu'à une concentration voisine de 10 p. 100, puis plus lentement au-delà (fig. 6). L'allure de la courbe suggère que l'on tend vers une valeur limite dans les conditions opératoires mises en œuvre.

La transformation de la courbe de Michaelis, selon LINEWEAVER et BURK, conduit à une droite (fig. 7) et la valeur trouvée pour la constante Km est sensiblement la moitié de celle obtenue en milieu aqueux, lorsqu'on exprime celle-ci en

mg d'huile d'olive ou en mole de trioléine. Toutefois, s'il était possible d'exprimer Km en « concentration d'interface », il est probable que la valeur ainsi obtenue ne serait pas essentiellement différente de celle mesurée en solution, du fait de l'état de dispersion important du substrat, réparti sur les particules de son. Il n'est malheureusement pas possible d'avoir une idée précise de l'aire interfaciale dans ces conditions.

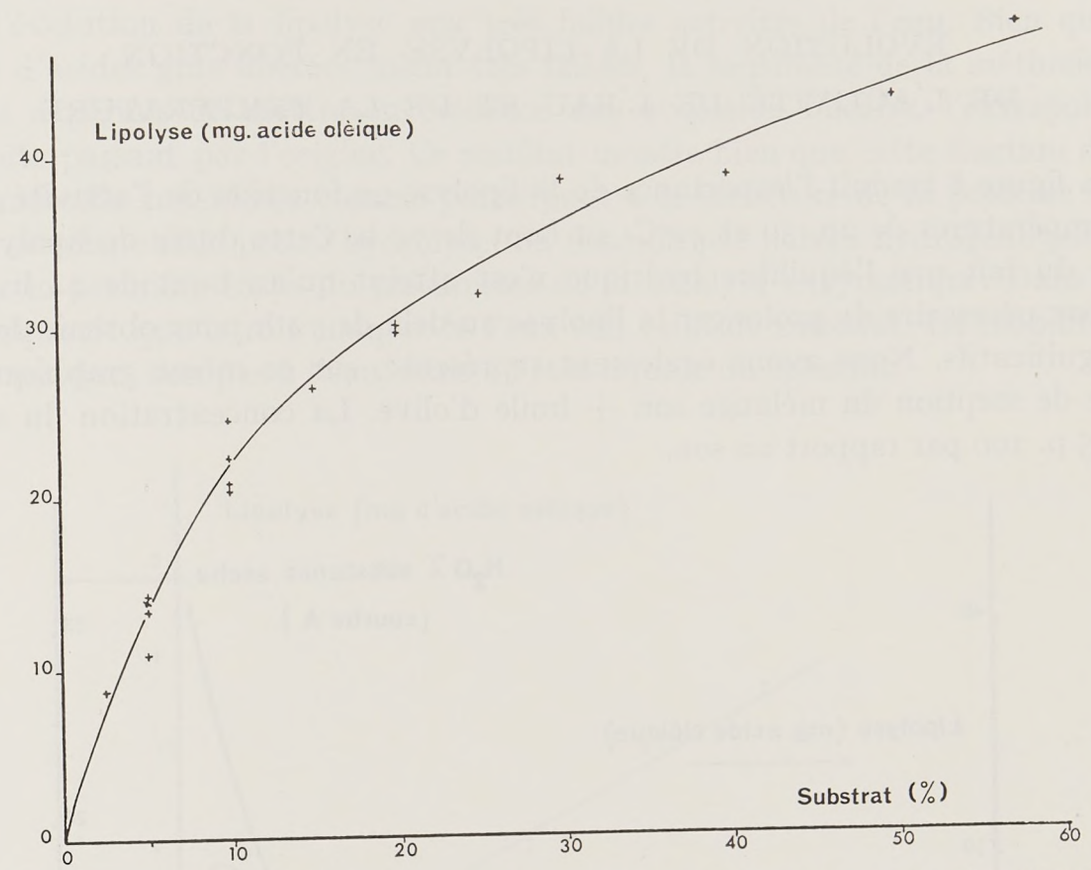


FIG. 6. — *Évolution de la quantité d'acides gras libérés* (exprimée en mg d'acide oléique) *en fonction de la quantité de substrat* (exprimée en g/100 g de la préparation enzymatique)
Température = 30°C, HR = 80 p. 100, temps = 72 h

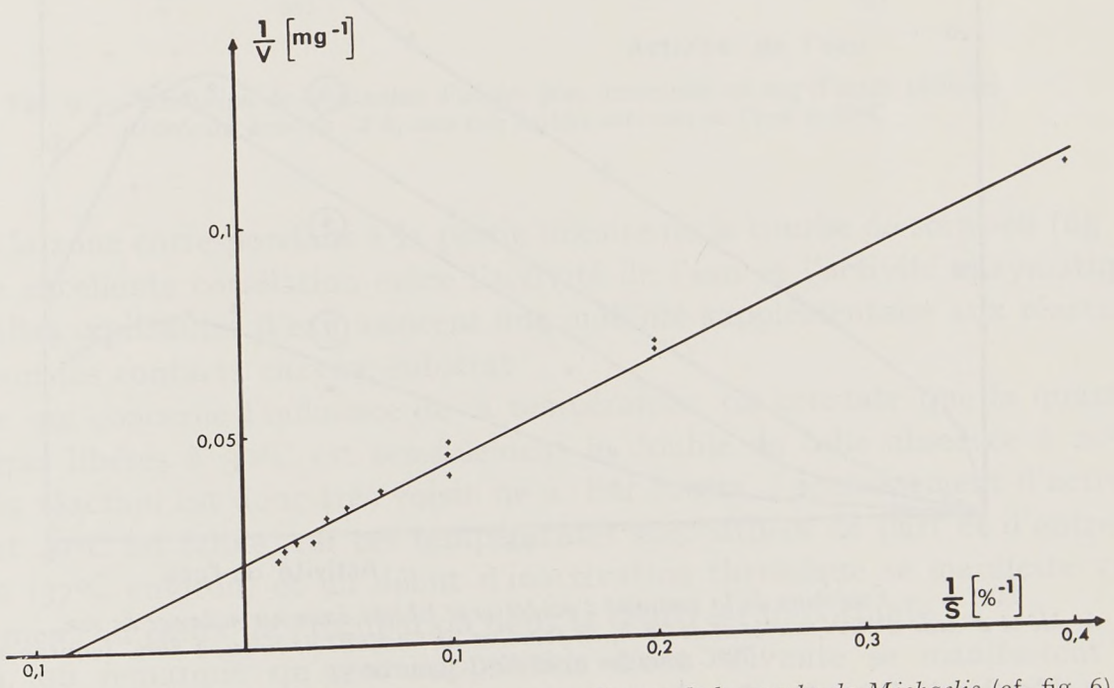


FIG. 7. — *Transformation, selon* LINEWEAVER *et* BURK, *de la courbe de Michaelis* (cf. fig. 6)

L'aspect cinétique de la réaction conduit à penser qu'il n'existe pas de différence fondamentale entre la catalyse enzymatique en émulsion et en milieu peu hydraté, bien que, dans ce dernier cas, la vitesse de la réaction soit considérablement plus faible. Ce ralentissement peut être attribué au fait que de tels milieux réduisent la mobilité des réactants et que l'on tende alors vers une réaction topochimique.

ÉVOLUTION DE LA LIPOLYSE EN FONCTION DE L'ACTIVITÉ DE L'EAU ET DE LA TEMPÉRATURE

La figure 8 traduit l'importance de la lipolyse en fonction de l'activité de l'eau aux températures de 20, 30 et 40°C, au bout de 72 h. Cette durée de lipolyse a été choisie du fait que l'équilibre hydrique n'est atteint qu'au bout de 24 h et qu'il n'est pas nécessaire de prolonger la lipolyse au-delà de 72 h pour obtenir des résultats significatifs. Nous avons également représenté, sur ce même graphique, l'isotherme de sorption du mélange son + huile d'olive. La concentration du substrat est de 5 p. 100 par rapport au son.

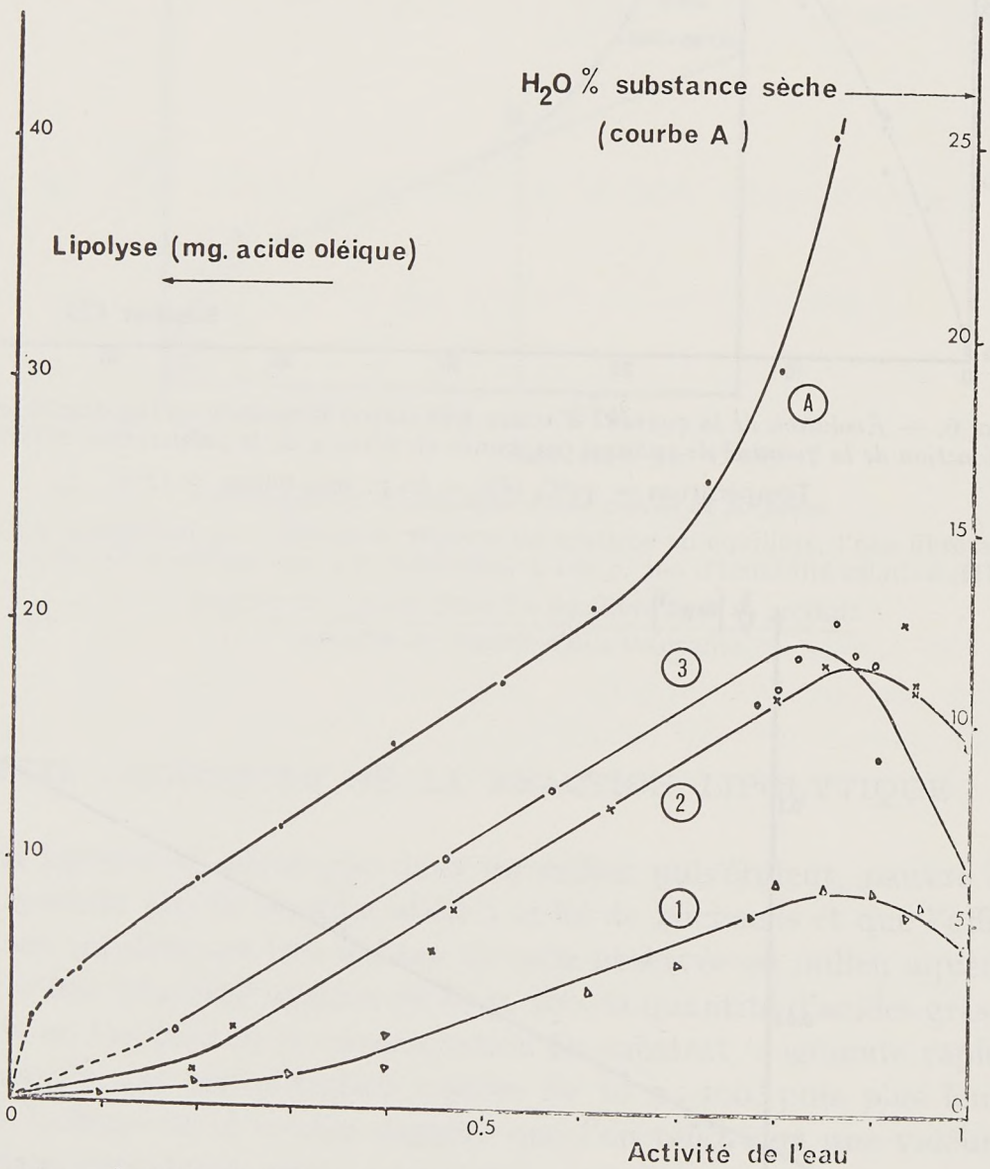


FIG. 8. — *Évolution de la quantité d'acides gras libérés dans un mélange de son, de blé et d'huile d'olive, au bout de 72 h, en fonction de l'activité de l'eau, à 20°C* (courbe 1), *30°C* (courbe 2) *et 40°C* (courbe 3)

L'isotherme de sorption du mélange enzyme-substrat est représenté par la courbe A

Les résultats obtenus conduisent aux observations suivantes qui confirment et complètent celles de ROTHE (1958) et de ACKER et BEUTLER (1965).

Contrairement aux résultats obtenus avec des hydrolases agissant sur des substrats solides (DRAPRON et GUILBOT, 1962), la lipolyse ne nécessite pas la présence d'eau solvante pour se manifester et les fractions d'eau les plus fortement liées peuvent directement intervenir dans la réaction. Ainsi la figure 9 permet de préciser l'évolution de la lipolyse aux très faibles activités de l'eau. Bien que les quantités d'acides gras libérées soient très faibles, la sensibilité de la méthode utilisée nous a permis de mettre en évidence une évolution linéaire, l'extrapolation de la droite passant par l'origine. Ce résultat montre bien que cette fraction d'eau, comprenant celle considérée comme participant à la structure de la protéine enzymatique, est disponible pour l'hydrolyse. Sa fixation par liaison hydrogène pourrait constituer la première étape du mécanisme de la catalyse enzymatique. Dans cette zone, il apparaît que le rôle unique de l'eau soit celui de substrat. La mobilité des réactants est due, non pas à l'eau, mais à l'état liquide du substrat.

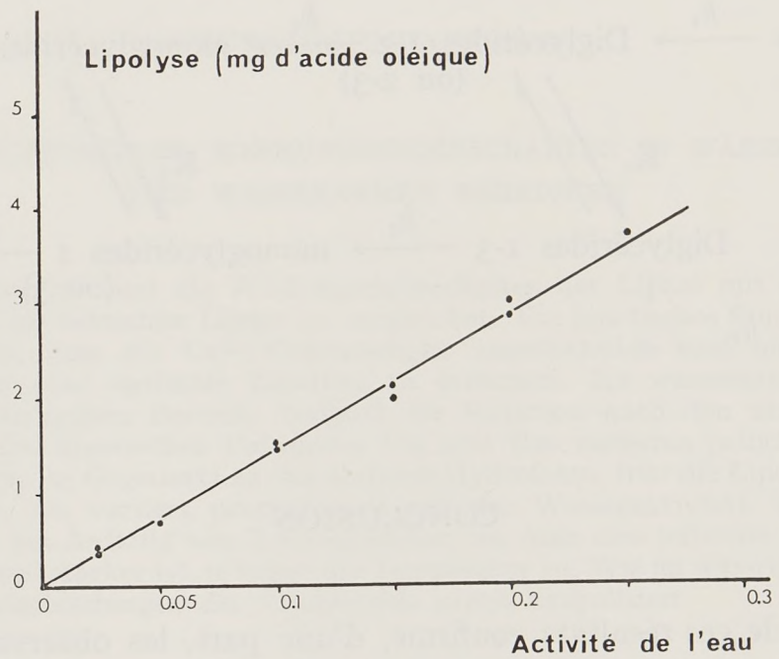


FIG. 9. — *Évolution de la quantité d'acides gras* (exprimée en mg d'acide oléique) *libérée au bout de 72 h, aux très faibles activités de l'eau à 30°C*

Dans la zone correspondant à la partie linéaire de la courbe de sorption (fig. 8), il y a une excellente corrélation entre l'activité de l'eau et l'activité enzymatique. Des quantités croissantes d'eau assurent une mobilité supplémentaire aux réactants et favorisent les contacts enzyme-substrat.

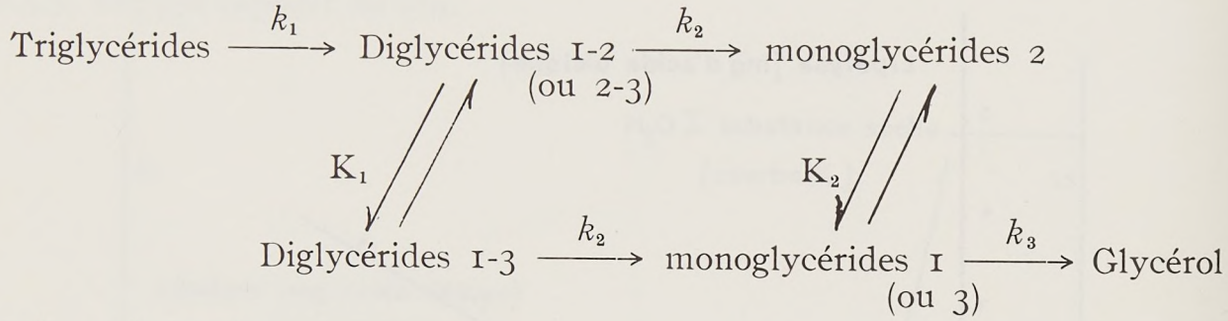
En ce qui concerne l'influence de la température, on constate que la quantité d'acides gras libérés à 30°C est sensiblement le double de celle observée à 20°C ; le Q_{10} de la réaction est donc très voisin de 2. Par contre, l'accroissement d'activité entre 30 et 40°C est faible, car ces températures sont situées de part et d'autre de l'optimum (37°C environ) et un début d'inactivation thermique se manifeste vraisemblablement au cours de l'incubation dont la durée est importante.

Enfin, on remarque qu'avec l'apparition d'eau solvante se manifestent un optimum d'activité, puis une inhibition apparente déjà décrite par d'autres auteurs

(Acker et Beutler, 1965), inhibition qui est due vraisemblablement à une inactivation de type hydrothermique, car la chute d'activité est d'autant plus accentuée que la température est plus élevée. Ces faits sont en accord avec les phénomènes de dénaturation des protéines et des enzymes. Cette inhibition, peu sensible jusqu'à des activités de l'eau de 0,8, se manifeste précisément lorsque l'eau solvante est présente en quantité importante.

On peut se demander si, dans de tels milieux où les réactions sont topochimiques, les règles de spécificité observées en milieux aqueux sont toujours valables. C'est pourquoi nous avons examiné l'évolution des pourcentages d'acides gras libérés, soit à partir des triglycérides de l'huile d'olive, soit à partir de triglycérides synthétiques de structure connue. Comme en milieu aqueux, les résultats montrent que la lipase agit préférentiellement au niveau des liaisons 1-3 des triglycérides, mais cette stéréospécificité est partiellement masquée par les acylmigrations intervenant au niveau des glycérides partiels.

L'ensemble des réactions peut alors se schématiser de la façon suivante :



avec $k_1 > k_2 > k_3$.

CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats confirme, d'une part, les observations antérieures et fournit, d'autre part, des éléments nouveaux permettant de préciser les modalités d'action de la lipolyse, aussi bien dans les milieux aqueux que dans les milieux peu hydratés, très proches des milieux biologiques naturels. De plus, ces résultats et les hypothèses que nous avons formulées nous ont permis de mieux connaître les caractéristiques de la lipase du blé et, de façon plus générale, de préciser le mécanisme d'action des lipases. En particulier, nous avons pu montrer l'intervention du calcium et de l'eau liée dans la réaction enzymatique.

Bien que nous soyons trés éloignés de l'enzymologie classique, les modalités d'action proposées à partir des réactions en solution sont encore valables, aussi bien dans les milieux émulsionnés polyphasiques que dans les milieux pulvérulents très pauvres en eau et pour lesquels les facteurs d'environnement sont primordiaux.

Cet ensemble de résultats, bien qu'incomplet, permet toutefois de mieux connaître les différents facteurs intervenant dans la lipolyse et d'être mieux armé sur le plan de la technologie pour maîtriser et contrôler ces processus.

SUMMARY

WHEAT LIPASE. CHARACTERISTICS OF ITS ACTION IN AQUEOUS AND DRY MEDIA

In an aqueous medium, the characteristics of lipase action are similar to those of microbial and animal tissues lipases. The kinetic study of *in vitro* reaction showed, in particular, that Ca^{++} ions are essential and that the bile salts are necessary for optimum lipolysis. In a dry medium which is essentially heterogeneous, the reaction follows the classical laws of enzymatic kinetics but the kinetic parameters Vm and Km vary with the water activity. Opposite to most other hydrolases, lipolysis occurs for very low water activities and is roughly proportional to the water activity. When there is solvent water, a partial inhibition is observed which increases proportionally with rising temperature. As in aqueous media, triglyceride ester bonds 1 and 3 are preferentially hydrolyzed.

ZUSAMMENFASSUNG

WEIZENLIPASE. WIRKUNGSEIGENSCHAFTEN IN WÄSSRIGEN UND WASSERARMEN BEREICHEN

Im wässrigen Bereich sind die Wirkungseigenschaften der Lipase mit den Eigenschaften der bakteriellen und der tierischen Lipase zu vergleichen. Ein kinetisches Studium der Reaktion *in vitro* hat ergeben, dass die Ca^{++}-Verbindungen unentbehrlich sind und die Gallensalze notwendig sind, um eine optimale Lipolyse zu erreichen. Im wasserarmen Bereich, und insbesondere im heterogenen Bereich, verläuft die Reaktion nach den klassischen Gesetzen der Enzymkinetik. Die kinetischen Parameter Vm und Km variieren jedoch in bezug auf die Aktivität des Wassers. Im Gegensatz zu den anderen Hydrolasen, tritt die Lipolyse bei schwacher Wasseraktivität auf. Sie variiert proportionell mit der Wasseraktivität, ausser bei starken Feuchtigkeiten oder bei Auftritt von Lösungswasser, wo man eine teilweise Inaktivierung beobachten kann, die umso stärker ist, je höher die Temperatur ist. Wie im wässrigen Bereich werden die Mono-und Tri-esterbindungen der Triglyzeride zuerst hydrolisiert.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Acker L., Beutler H. O., 1965. Über die Tätigkeit der lipasen in Getreidemahlprodukten in Abhängigkeit von der relativen Luftfenchtigkeit. *Getreide u. Mehl*, **15** (1), 4-6.

Ansted C. N., Hansen I. A., 1968. A statistical analysis of the main effects and interactions of the pH, taurocholate and calcium on pancreatic lipase activity. *Chem. Phys. Lipids*, **2**, 343.

Benzonana G., 1968. Sur le rôle des ions calcium durant l'hydrolyse des triglycérides insolubles par la lipase pancréatique, en présence de sels biliaires. *Bioch. Biophys. Acta*, **151** (1), 137-146.

Caillat J.-M., 1970. *Contribution à l'étude de la lipase du blé : isolement, caractéristiques de son action en milieux aqueux et peu hydraté.* Thèse Docteur-Ingénieur. Fac. Sci. Paris n° C. N. R. S. 4061.

Desnuelle P., Constantin M. J., Baldy J., 1955. Technique potentiométrique pour la mesure de l'activité de la lipase pancréatique. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **37** (2-3), 285-290.

Drapron R., Guilbot A., 1962. Contribution à l'étude des réactions enzymatiques dans les milieux biologiques peu hydratés. La dégradation de l'amidon par les amylases en fonction de l'activité de l'eau et de la température. *Ann. Technol. agric.*, **11** (3), 175-218 ; **11** (4), 275-317.

Drapron R., N'Guyen Xuan Anh, Launay B., Guilbot A., 1969. Evolution and distribution of wheat lipase activity in the course of germination. *Cereal. Chem.*, **46** (6), 647-655.

Drapron R., Ritzenthaler G., Launay B., 1966. Sur l'isolement de la lipase de la gemmule de blé germé. *C. R. Acad. Sci.*, **263**, 1168-1170.

Drapron R., Sclafani L., 1969. Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. *Ann. Technol. agric.*, **18** (1), 5-16.

Ota Y., Yamada K., 1966. Lipase from *Candida paralipolytica*. Part II. Alkaline-earth metal ions as the cofactor in the shaken system containing no emulsifier. *Agric. biol. Chem.*, **30** (10), 1030-1038.

Perl M., Diamant Y., 1963. The lipase of soya bean : purification and properties of the enzyme. *Israel J. Chem.*, **1** (3 *a*), 192-193.

Rothe M., 1958. Eigenschaften und Reacktionverhalten planzlicher Samenlipase im natürlichen Milieu. *Mitt. Etnährungsforsch.*, **3** (1), 21-51.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 287-308.

LES MÉTHODES DE MESURE DE L'ACTIVITÉ LIPOXYGÉNASIQUE. MISE AU POINT D'UNE NOUVELLE MÉTHODE

J. NICOLAS, Y. BEAUX et R. DRAPRON
avec la collaboration technique de Françoise DUNAS

Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert, 91305 Massy

RÉSUMÉ

Il résulte de l'étude critique expérimentale des différentes méthodes préconisées pour la mesure de l'activité lipoxygénasique que deux d'entre elles seulement apparaissent particulièrement bien adaptées en raison de leur spécificité. L'une consiste à mesurer, par polarographie, la quantité d'oxygène consommé, l'autre fait intervenir la mesure de la quantité d'hydroperoxydes formés, par l'intermédiaire du dosage spectrophotométrique des doubles liaisons conjuguées. Toutes deux conduisent à des résultats comparables lorsqu'on respecte strictement les conditions de milieu (état et concentration du substrat, pH, force ionique, température, teneur en oxygène dissous). Elles peuvent être considérées comme méthodes fondamentales et servir de référence pour d'autres méthodes plus rapides et pratiques.

Cette étude a permis de mettre au point une nouvelle méthode plus facilement accessible aux laboratoires de contrôle industriel. Celle-ci, faisant intervenir l'oxydation du carmin d'indigo en un composé incolore, ne nécessite que l'emploi d'un simple colorimètre. Elle permet d'apprécier de faibles activités et donne des résultats comparables à ceux fournis par les méthodes de référence.

INTRODUCTION

La lipoxygénase, découverte en 1932 par ANDRÉ et HOU, possède une action catalytique importante lors de différents processus technologiques. C'est pourquoi cet exposé a pout but de faire un examen critique et comparatif des techniques de

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-135-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

mesure de l'activité lipoxygénasique afin d'en dégager celles qui sont les mieux adaptées, tant aux points de vue spécificité et sensibilité que facilité d'exécution.

Avant cet examen, nous rappellerons le mode d'action de cette enzyme : la lipoxygénase (E. C. 1.13.1.13) catalyse l'oxydation, par l'oxygène moléculaire, des acides gras qui possèdent le système de doubles liaisons non conjuguées *cis-cis* 1,4 pentadiène dont le groupement méthylène intermédiaire est en position ω8. Il se forme un hydroperoxyde à doubles liaisons conjuguées *cis-trans* avec production transitoire d'un radical peroxyde libre. Il en résulte qu'elle n'est active que sur les acides gras essentiels : acide linoléique (9-12 octadécadiènoique), acide α linolénique (9-12-15 octadécatriènoïque).

Le mode d'action proposé par TAPPEL *et al.* (1953) et complété depuis par HAMBERG et SAMUELSSON (1967) pour la lipoxygénase du soja, est composé de 4 stades.

Soit le substrat $R—\underset{cis}{CH=CH}—\underset{\omega 8}{CH_2}—\underset{cis}{CH=CH}—R'$.

Le premier stade correspond à l'élimination d'un hydrogène sur le groupement méthylène situé en ω8,

$$R—CH=CH—CH^{\bullet}—CH=CH—R'.$$

Celui-ci est suivi d'une isomérisation qui conduit à des doubles liaisons conjuguées *cis-trans*, par réarrangement des orbitales π,

$$R—\dot{C}H—\underset{trans}{CH=CH}—\underset{cis}{CH=CH}—R'.$$

Il y a ensuite fixation du biradical oxygène $^{\bullet}O—O^{\bullet}$ sur le carbone situé en ω6,

$$R—\underset{\displaystyle O—O^{\bullet}}{\underset{|}{CH}}—\underset{trans}{CH=CH}—\underset{cis}{CH=CH}—R'.$$

Le stade ultime de la réaction enzymatique est la fixation d'un hydrogène par le radical peroxyde pour donner un hydroperoxyde

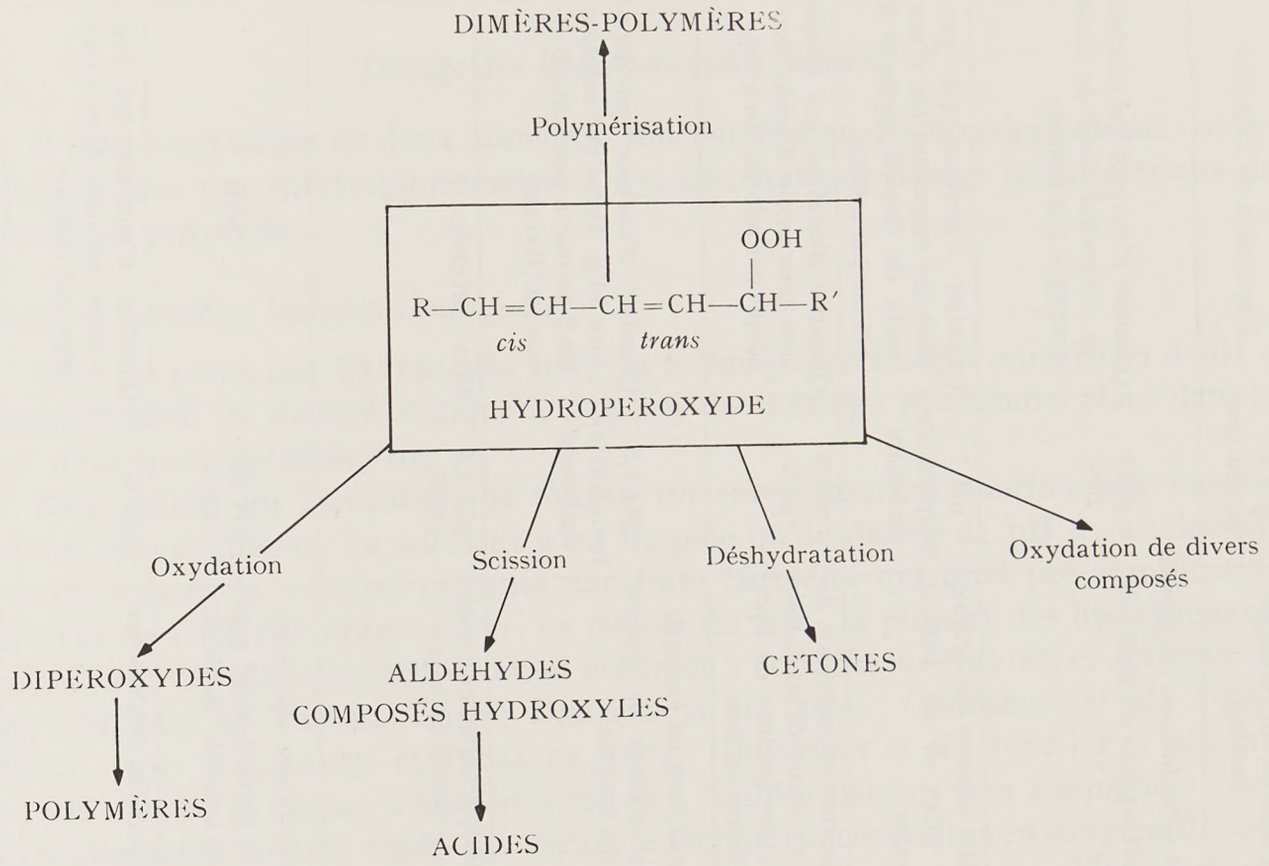
$$R—\underset{\displaystyle OOH}{\underset{|}{CH}}—\underset{trans}{CH=CH}—\underset{cis}{CH=CH}—R'.$$

L'hydroperoxyde formé peut subir un certain nombre de transformations qui conduisent à des composés identiques à ceux obtenus par oxydation spontanée (LEA, 1962) (tabl. 1).

Notons cependant que la spécificité d'oxydation sur le carbone ω6 est contestée par plusieurs auteurs (PRIVETT *et al.*, 1955 ; VELDINK *et al.*, 1970) notamment pour d'autres lipoxygénases que celles du soja (GARDNER et WEISLEDER, 1970 ; GALLIARD et PHILLIPS, 1971 ; VELDINK *et al.*, 1972).

TABLEAU I

Différentes voies possibles de transformation des hydroperoxydes
(suivant LEA, 1962)



EXAMEN CRITIQUE DES DIFFÉRENTS TYPES DE MÉTHODES

Du mode d'action de l'enzyme, il résulte que l'on peut envisager trois types de méthodes faisant intervenir le dosage, soit des acides gras transformés, soit des hydroperoxydes formés, soit de l'oxygène consommé.

Les différentes caractéristiques des techniques déjà utilisées sont résumées dans le tableau 2.

La première difficulté qui se présente est celle posée par l'état du substrat ; en effet, celui-ci est constitué d'un composé insoluble dans l'eau qu'il s'agit de rendre accessible à l'enzyme. L'acide linoléique retenu par la majorité des auteurs est utilisé sous forme de linoléate alcalin, d'esters de méthyle ou d'éthyle dispersés dans une solution aqueuse tamponnée contenant ou non un agent tensio-actif. Il en résulte que le degré de dispersion du substrat varie suivant les techniques utilisées et qu'il est difficilement reproductible d'une expérience à l'autre.

Une deuxième difficulté réside dans l'oxydation spontanée du substat; c'est pourquoi il est nécessaire, d'une part, de le préparer et le conserver en absence d'oxygène, d'autre part, d'effectuer des essais à blanc pour tenir compte de l'oxydation spontanée qui se développe pendant la réaction enzymatique.

TABLEAU 2. — *Différents types de techniques de mesure de l'activité lipoxygénasique utilisées*

Types de mesure	Substrat	Préparation enzymatique examinée	pH et température	Expression de l'activité	Références
		Dosage des doubles liaisons conjuguées			
Mesure spectrophotométrique à 234 nm, enregistrement automatique de la densité optique en fonction du temps	Acide linoléique ou linoléate de méthyle dispersé dans une solution tampon d'ammoniaque et de chlorure d'ammonium à pH 9	Extrait aqueux de farine de soja	pH 9 20°C	Quantité d'enzyme qui produit un microéquivalent de diène conjugué par minute	TAPPEL *et al.* (1953)
Prises aliquotes, en fonction du temps, du mélange réactionnel placées dans l'éthanol ; mesure de la densité optique à 234 nm	Acide linoléique dispersé dans une solution de tampon borate à pH 7 contenant du « Tween 20 »	Extraits aqueux de graines de soja ou de haricot broyées	pH 7 température ambiante	Quantité d'enzyme qui produit une augmentation d'une unité de densité optique à 234 nm par minute	SURREY (1964)
Id. Méthode de TAPPEL *et al.* (1953)	*Id.* Méthode de SURREY (1964)	Préparation commerciale de lipoxygénase de soja. Préparation purifiée de lipoxygénase de fève	pH 7 25°C	Quantité d'enzyme qui oxyde une micromole d'acide linoléique par minute (BEAUX)	BEN AZIZ *et al.* (1970) BEAUX (1970)
		Dosage de la fonction peroxyde			
Mesure spectrophotométrique à 460 nm de l'oxydation couplée du β-carotène ; enregistrement automatique en fonction du temps	Linoléate d'éthyle dans une solution de tampon phosphate à pH 6,5	Extrait aqueux de graines de soja broyées	pH 6,5 température ambiante	Quantité d'enzyme qui décolore 30 p. 100 d'une solution de β-carotène pendant 30 secondes (BALLS)	SUMNER et SUMNER (1940) BALLS *et al.* (1943)
Oxydation de Fe^{++} en Fe^{+++} ; prises aliquotes en fonction du temps ; mesure colorimétrique à 480 nm du complexe ferrithiocyanique	Acide linoléique ou trilinoléine dispersé dans une solution de tampon borate, acétate ou phosphate	Extraits partiellement purifiés de farine de soja	pH 8,3 20°C	Non précisée	KOCH *et al.* (1958)
		Dosage de l'oxygène consommé			
Technique micromanométrique de Warburg	Acide linoléique dispersé dans une solution aqueuse de « Triton X 100 »	Extraits partiellement purifiés de semoule de blé dur	pH 6,5 30°C	*idem*	IRVINE et ANDERSON (1953)
Polarographie	Mélange d'acides linoléique et linolénique dispersés dans une solution de tampon phosphate pH 6,7	Extrait aqueux de blé broyé	pH 6,7	Quantité d'enzyme qui consomme un microlitre d'oxygène par minute	ROHRLICH *et al.* (1959)
Polarographie	*Idem* méthode de TAPPEL *et al.* (1953)	Préparation purifiée de lipoxygénase de soja	pH 9 25°C	Quantité d'enzyme qui consomme une micromole d'oxy-	MITSUDA *et al.* (1967)

Dosage des acides gras transformés

Ce type de mesure, certainement le plus spécifique, n'a jamais été mis en œuvre par suite des difficultés opératoires qu'il présente (Beaux, 1970).

Dosage des hydroperoxydes formés

Il peut s'envisager de deux manières, soit par dosage des doubles liaisons conjuguées *cis-trans* par spectrophotométrie à 234 nm, soit par dosage colorimétrique de la fonction peroxyde.

Dosage des doubles liaisons conjuguées.

Mise au point par Tappel dès 1953, la technique consiste à enregistrer à pH 9 l'augmentation de densité optique à 234 nm du mélange réactionnel placé dans la cuve d'un spectrophotomètre.

Bien qu'elle ait l'avantage de fournir un enregistrement continu, elle montre certains inconvénients. Le substrat n'est limpide qu'au-dessus de pH 9 ; au-dessous de cette valeur, la solution présente une forte turbidité qui rend peu significative la valeur de l'activité obtenue ; or, en dehors du soja, la plupart des lipoxygénases étudiées ont un pH optimum d'action voisin de 7 ou inférieur (Irvine et Anderson, 1953 ; Siddiqi et Tappel, 1956 ; Dillard *et al.*, 1960 ; Grossman *et al.*, 1969 ; Beaux, 1970 ; Galliard et Phillips, 1971 ; Grossman *et al.*, 1972.) Par ailleurs, aux pH élevés, le risque d'isomérisation des doubles liaisons non conjuguées n'est pas négligeable (Wolff, 1968). En outre, le facteur concentration en oxygène dissous (second substrat de la lipoxygénase) intervient notablement et de nombreux auteurs qui ont utilisé cette méthode n'en ont pas tenu compte. Surrey (1964) évite la plupart de ces inconvénients en utilisant un substrat constitué par de l'acide linoléique dispersé dans une solution aqueuse tamponnée contenant un agent tensioactif, le « Tween 20 ». Ceci permet d'avoir une solution limpide et un substrat dispersé au maximum à pH 7. En outre, la réaction s'effectuant dans un milieu constamment saturé en oxygène, il en résulte une activité maximale par rapport à ce dernier. A divers intervalles de temps, des prises aliquotes du mélange réactionnel sont effectuées. Celles-ci sont introduites dans de l'éthanol absolu qui bloque la réaction et extrait les hydroperoxydes, les densités optiques sont mesurées à 234 nm après dilution éventuelle. Cependant, cette technique a l'inconvénient de ne pas fournir un enregistrement continu du phénomène. Ceci entraîne des difficultés pour la détermination de la vitesse initiale, en particulier, lorsqu'il existe une période d'induction de la réaction et que l'on utilise de l'acide linoléique très pur (Haining et Axelrod, 1958).

Beaux (1970) et Ben Aziz *et al.* (1970) ont aménagé une technique utilisant le substrat de Surrey, la réaction enzymatique s'effectuant dans la cuve d'un spectrophotomètre enregistreur ; on obtient ainsi directement la courbe d'activité en fonction du temps. Certaines critiques relatives à la méthode de Tappel s'appliquent également pour cette technique (concentration en oxygène dissous, turbidité).

Un des reproches les plus importants que l'on puisse faire au substrat préconisé par Surrey est l'utilisation d'un agent tensio-actif (Tween 20) susceptible d'inhiber

partiellement la réaction comme l'ont montré divers auteurs (Haining et Axelrod, 1958 ; Dillard *et al.*, 1961 : Surrey, 1964 ; Ben Aziz *et al.*, 1970 ; Koch *et al.*, 1971). Cependant, cet inconvénient est contrebalancé par l'avantage de rendre l'acide linoléique plus accessible à l'enzyme.

Dosage de la fonction peroxyde.

Il est fondé sur les propriétés oxydantes des hydroperoxydes vis-à-vis d'un certain nombre de substances, la transformation étant estimée colorimétriquement.

Le β-carotène a été la première substance utilisée (Sumner et Sumner, 1940 ; Balls *et al.*, 1943). Cette méthode est aujourd'hui abandonnée, car il est difficile de tenir compte de l'oxydation du β-carotène qui s'effectue spontanément et sous l'action d'une oxydase spécifique éventuellement présente dans les extraits enzymatiques (Kies *et al.*, 1969).

Les ions Fe^{++} ont aussi été utilisés (Koch *et al.*, 1958) ; ceux-ci sont oxydés en ions Fe^{+++} et dosés sous forme de complexe ferrithiocyanique à 480 nm. Cependant, le complexe se dissocie par simple dilution et la coloration ne suit pas la loi de Beer, ce qui entraîne de nombreuses causes d'erreurs rendant cette méthode peu utilisable.

Dosage de l'oxygène consommé.

La méthode manométrique d'Irvine et Anderson (1953) a été autrefois très utilisée, mais elle est aujourd'hui pratiquement abandonnée car elle est longue et l'inertie de l'appareil de Warburg rend impossible toute détermination précise de la vitesse initiale de la réaction.

Cette technique a été avantageusement remplacée par une méthode électrochimique, basée sur la mesure polarographique de la concentration en oxygène dissous (Rohrlich *et al.*, 1959 ; Mitsuda *et al.*, 1967). Celle-ci permet un enregistrement continu du phénomène en évitant les inconvénients des méthodes spectrophotométriques. Le reproche que l'on peut faire à cette technique est son manque de spécificité ; c'est pourquoi il est nécessaire d'effectuer un essai à blanc pour tenir compte de la présence éventuelle d'autres systèmes oxydo-réducteurs utilisant l'oxygène dans les extraits enzymatiques non purifiés.

Il résulte de cet examen que les méthodes qui nous apparaissent les moins critiquables sont celles utilisant la mesure polarographique de l'oxygène consommé, mise au point par Mitsuda *et al.* (1967) et la mesure spectrophotométrique des doubles liaisons conjuguées, préconisée par Surrey (1964). Elles se révèlent faciles à mettre en œuvre et permettent la mesure rapide de la vitesse de la réaction enzymatique. C'est pourquoi nous avons limité notre étude expérimentale à l'examen comparatif de ces deux méthodes.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE COMPARATIVE DES MÉTHODES SPECTROPHOTOMÉTRIQUE ET POLAROGRAPHIQUE

Matériel et réactifs

Matériel.

Polarographe enregistreur muni d'une électrode de Clark (Oxygraphe Gilson, type KM) ; cellules de mesure de 3 et 10 ml thermostatées à 25°C ;
Spectrophotomètre enregistreur à double faisceau (Beckmann).

Réactifs.

Acide linoléique à 95 p. 100 de pureté (vérifié par chromatographie en phase gazeuse), origine Fluka ;
« Tween 20 » (polyoxyéthylène monolaurate de sorbitol) ;
Solution de tampon borate (pH 9, 0,05 M) ;
NaOH et HCl (N/1), éthanol absolu ;
Azote et air comprimés.

Modes opératoires

Préparation de l'extrait enzymatique.

Extrait aqueux non purifié de farine de fève (*Vicia faba* L.) : mettre 50 g de farine de fève en suspension dans 500 ml de tampon acétate (0,1 M ; pH 4,5) à température ambiante. Après une agitation de 30 minutes, centrifuger à 13 000 tours par minute pendant 30 minutes. Le surnageant constitue la préparation enzymatique.

Lipoxygénase purifiée de fève, selon BEAUX (1970).

Préparation du substrat (selon SURREY, 1964).

Toutes les solutions utilisées sont préalablement débarrassées de l'oxygène dissous par un barbotage d'azote. Les manipulations se font autant que possible sous atmosphère d'azote. Dans un flacon, introduire successivement 0,5 ml de Tween 20 et 10 ml de tampon borate ; agiter pendant 1 minute, puis ajouter 0,56 g d'acide linoléique. Après agitation vigoureuse pendant 2 minutes, ajouter 2 ml de soude N/1. Agiter jusqu'à l'obtention d'une solution limpide et amener le volume à 100 ml par addition de tampon borate. La solution obtenue, placée à 0-4°C, est utilisable pendant 2 à 3 jours ; au-delà, le degré d'oxydation spontanée de l'acide gras devient trop important. Juste avant l'utilisation, diluer le substrat (2×10^{-2} M en acide linoléique) par du tampon borate pour l'amener à la concentration désirée et ajuster le pH à 7 avec de l'acide chlorhydrique normal.

Dosage de l'oxygène consommé.

Régler la tension de polarisation de l'électrode de CLARK à 0,8 volt. Introduire 2,7 ml de substrat, saturé d'air à 25°C, dans la cellule de 3 ml (ou 9 ml dans la cellule de 10 ml). Régler le 100 p. 100 de l'échelle de l'enregistreur. Suivant la cellule employée, ajouter 0,3 ml (ou 1 ml) de préparation enzymatique convenablement diluée. Enregistrer la variation de l'intensité du courant polarographique en fonction du temps.

La vitesse initiale de la réaction est donnée par la pente à l'origine des courbes obtenues. Calculer la correspondance entre l'échelle des intensités et les concentrations d'oxygène, sachant que, saturé d'air à 25°C, le substrat contient 250 µM (± 5 µM) d'oxygène (les déterminations d'oxygène dissous ont été faites suivant la méthode de WINKLER, 1955). Les résultats sont exprimés en µM d'oxygène consommé par minute.

Dosage des doubles liaisons conjuguées.

Seule la cellule de 10 ml est utilisée. Des prises aliquotes de 1 ml sont effectuées au cours de l'enregistrement polarographique ; celles-ci sont transférées dans des tubes contenant 2 ml d'éthanol absolu pour bloquer la réaction. La mesure de la densité optique à 234 nm est effectuée ensuite après dilution éventuelle par de l'éthanol à 60 p. 100 (V/V). La solution, placée dans la cuve de référence, contient l'extrait enzymatique inactivé par l'éthanol et le substrat au temps zéro, dans les mêmes proportions que dans la solution de la « cuve-essai » (2 ml d'éthanol absolu + 0,1 ml de préparation enzymatique + 0,9 ml de substrat, puis dilution éventuelle

par l'éthanol à 60 p. 100). A partir de la valeur de la densité optique obtenue, la quantité d'hydroperoxydes formés (exprimée en μM) est calculée en utilisant comme $\varepsilon_{M\,234}$: 28000 (PRIVETT *et al.*, 1955).

Influence de la concentration en substrat

Ces expériences ont été menées en utilisant la cellule de 3 ml dans laquelle sont introduits 2,7 ml de substrat à des concentrations allant de 2×10^{-2} M à $0{,}05 \times 10^{-2}$ M. Au temps zéro, 0,3 ml de préparation enzymatique sont ajoutés.

Le pH optimum d'activité de la lipoxygénase de fève est très voisin de 7 et la courbe d'activité en fonction du pH présente un sommet très étroit autour de 7 (BEAUX, 1970). C'est pourquoi, afin d'avoir un pH constant pour toutes les solutions de substrat, le substrat initial (2×10^{-2} M) et le tampon borate utilisé pour les différentes dilutions sont ajustés à pH 7 avant mélange.

Les courbes de la figure 1, représentant l'évolution de la concentration en oxygène en fonction du temps, sont linéaires jusqu'à disparition totale de l'oxygène dissous pour les fortes concentrations en substrat (de 2×10^{-2} M à $0{,}2 \times 10^{-2}$ M).

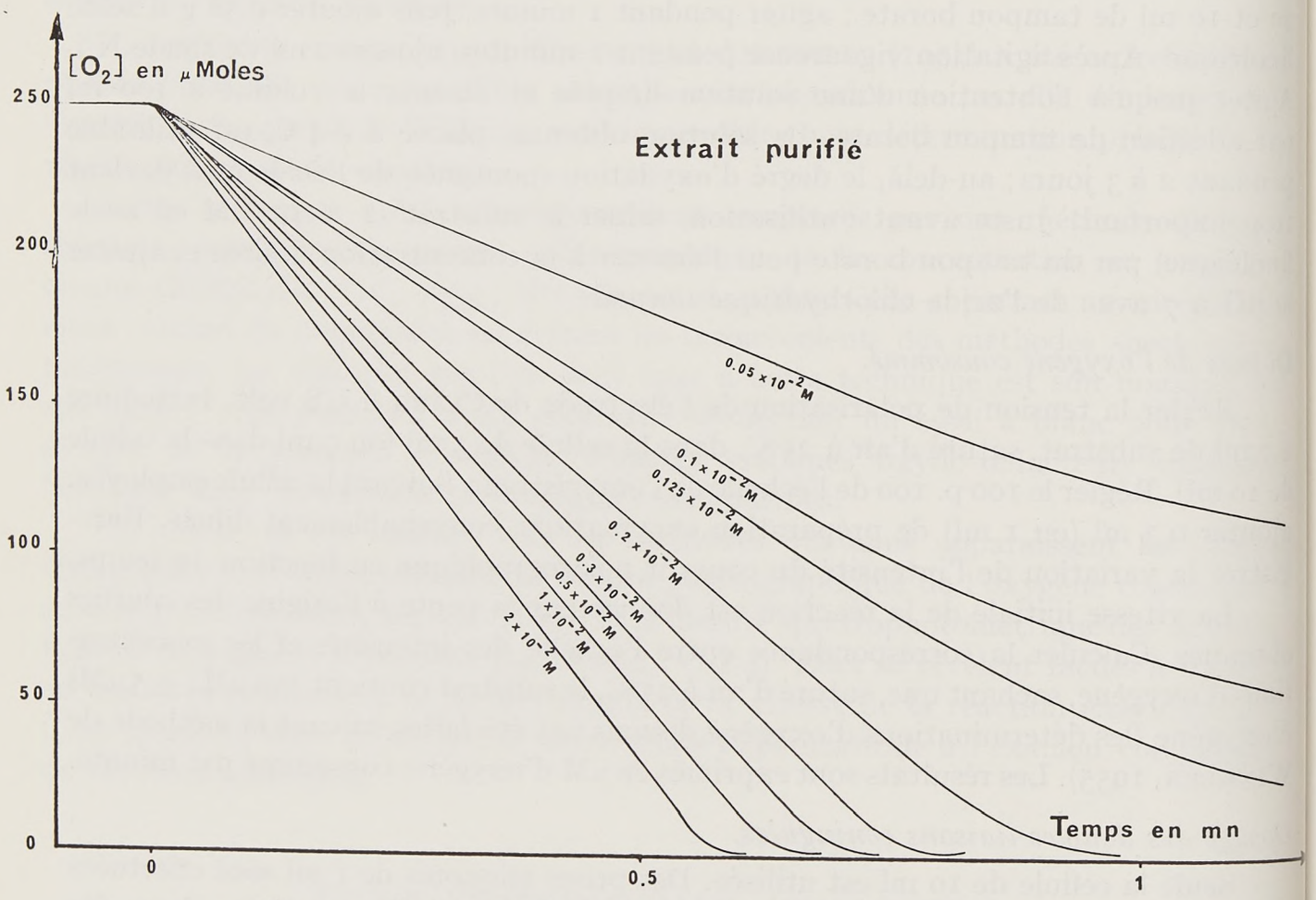


FIG. 1. — *Évolution de l'activité lipoxygénasique, en fonction du temps, à diverses concentrations en acide linoléique*
(Méthode polarographique)

Pour les faibles concentrations, à partir de $0{,}125 \times 10^{-2}$ M, les courbes s'incurvent et les vitesses tendent vers zéro bien avant consommation totale de l'oxygène ou de l'acide linoléique.

Ce phénomène pourrait résulter d'une diminution de la quantité d'acide gras disponible due à la simple consommation de ce dernier. Cependant ceci explique mal que la vitesse tende vers zéro avant que tout l'acide gras théoriquement disponible ne soit utilisé en totalité. Ce phénomène peut être également attribué au degré de dispersion du substrat ; en effet, bien qu'on ne décèle aucune hétérogénéité au microscope optique, le substrat peut être sous forme de micelles et il est possible que seule une faible partie de l'acide linoléique soit à l'état de molécules isolées ou facilement accessibles à l'enzyme.

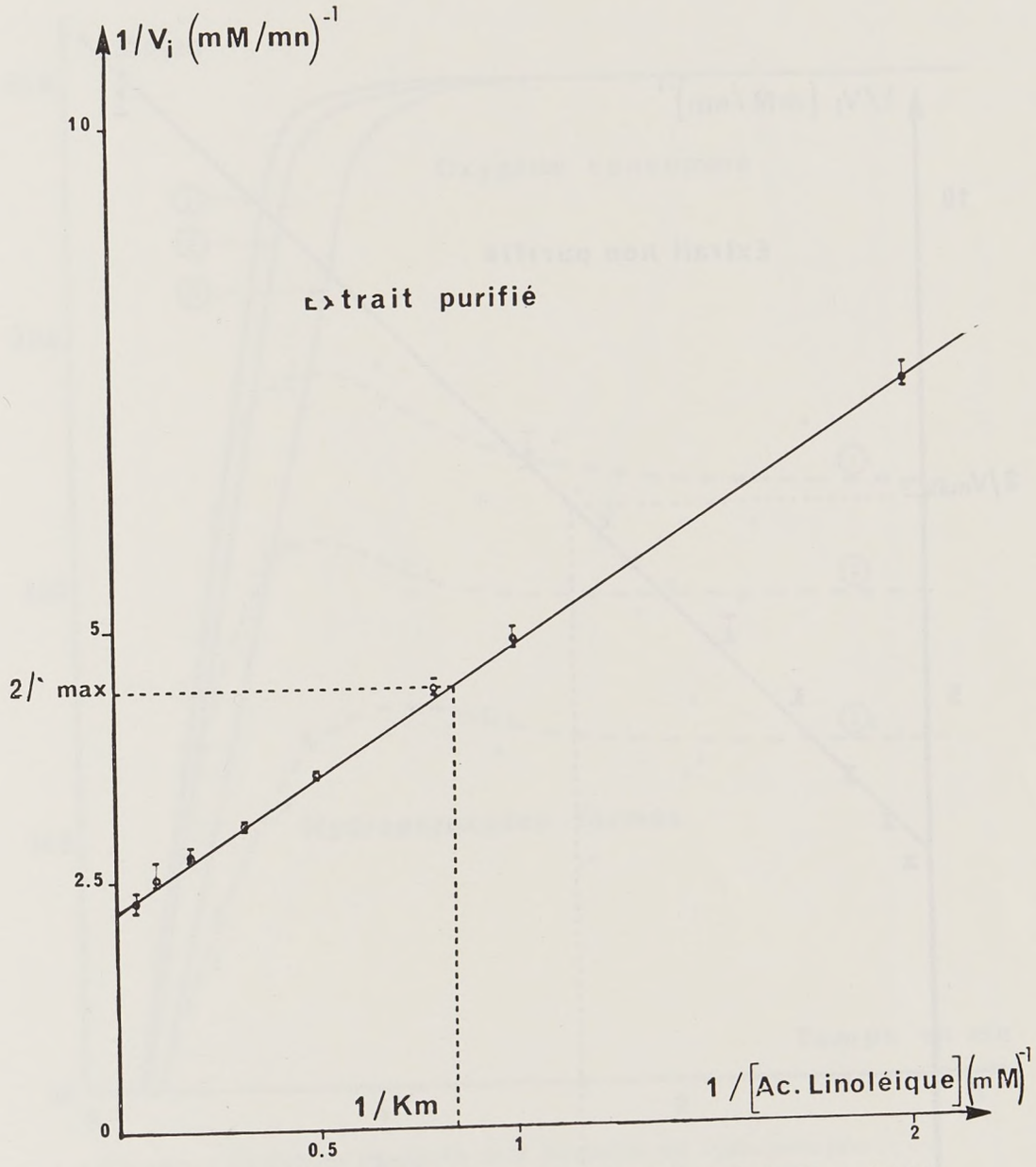


FIG. 2. — *Représentation selon* LINEWEAVER *et* BURK *de la vitesse initiale en fonction de la concentration en acide linoléique*
(méthode polarographique)

● : Moyenne de 3 essais
Droite obtenue par la méthode des moindres carrés
Extrait enzymatique purifié

On peut aussi faire l'hypothèse d'une inhibition de l'enzyme, soit par compétition entre le substrat et les produits de la réaction, soit par dégradation de la protéine enzymatique de manière autocatalytique (SMITH et LANDS, 1970 et 1972)

ou par l'intervention des hydroperoxydes réagissant sur certains acides aminés tels que l'histidine, la sérine ou le tryptophane (ROUBAL et TAPPEL, 1966).

Quoi qu'il en soit, la mesure de la vitesse initiale reste précise dans toute la gamme des concentrations utilisées. On observe sur la figure 2 que la représentation classique suivant la transformation de LINEWEAVER et BURK aboutit à une droite, ce qui traduit une cinétique michaelienne. Cette droite nous conduit à un K_M égal à $1{,}2 \times 10^{-3}$ M pour la lipoxygénase purifiée de la fève, alors que dans le cas de l'extrait non purifié on obtient un K_M égal à $1{,}1 \times 10^{-3}$ M (fig. 3).

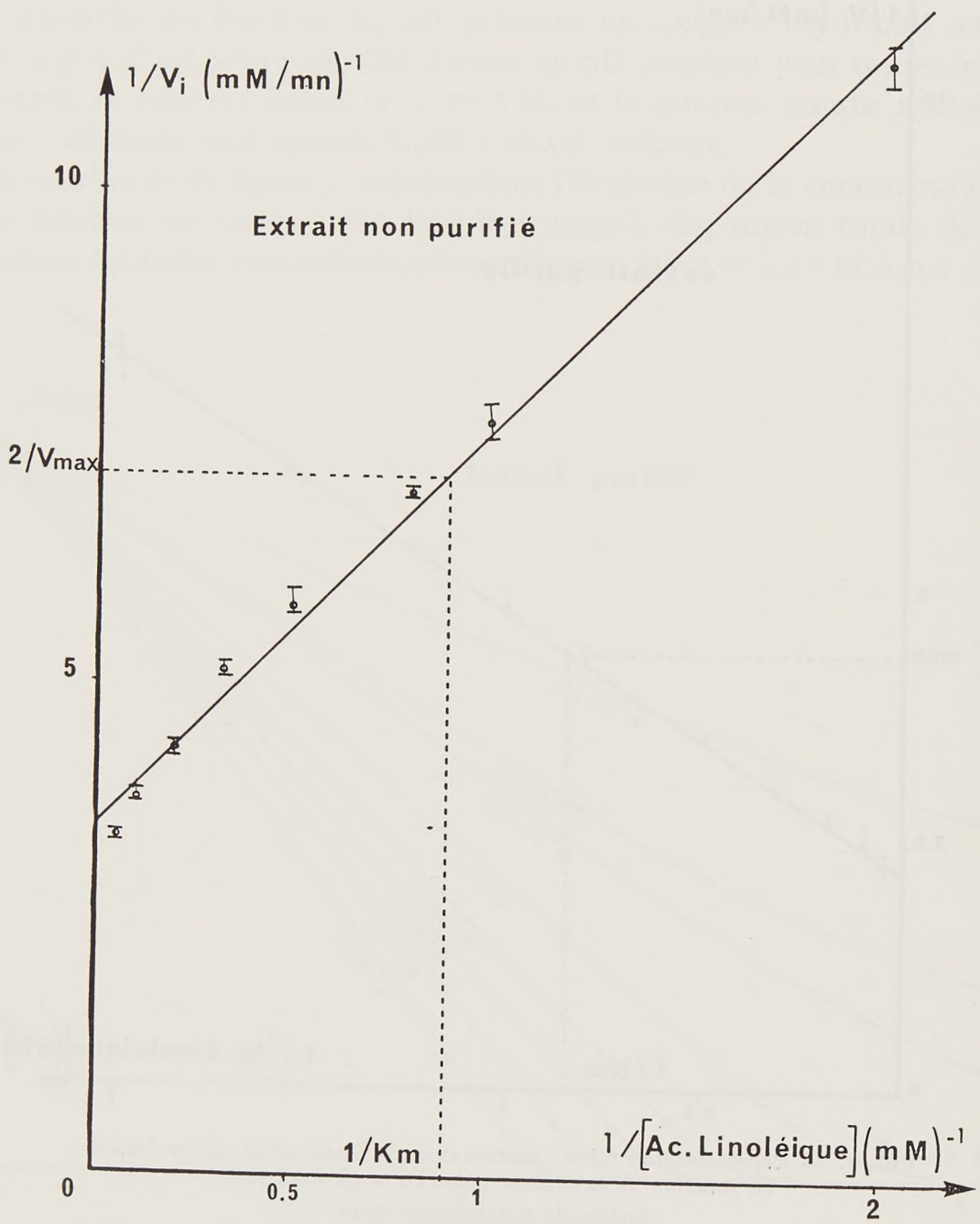


FIG. 3. — *Cf. légende fig. 2*
Extrait enzymatique non purifié

Ces résultats montrent que, malgré l'existence possible dans l'extrait non purifié d'autres systèmes oxydo-réducteurs impliquant l'oxygène, ceux-ci ne faussent pas la mesure de l'activité lipoxygénasique vraie par polarographie.

Comparaison entre les quantités d'hydroperoxydes formés et d'oxygène consommé

Nous avons utilisé, pour ces expériences, la cellule de 10 ml et un extrait enzymatique purifié.

Pour chaque concentration examinée, les essais ont été réalisés en triple exemplaire. Pour chaque expérience, cinq mesures spectrophotométriques à divers temps ont été effectuées. Les courbes de la figure 4, établies à partir des valeurs moyennes

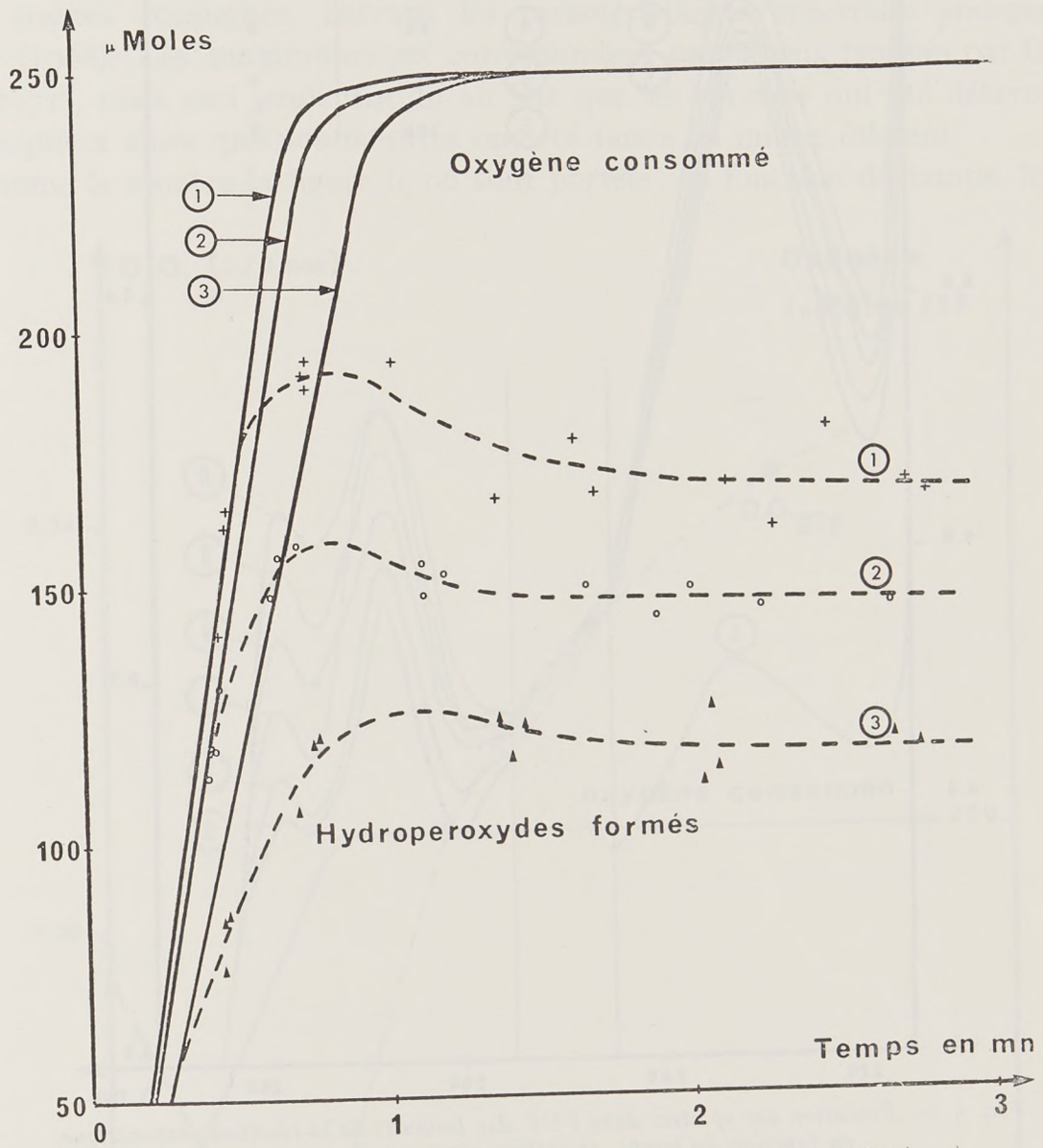


FIG. 4. — *Évolutions comparées de la formation des hydroperoxydes (- - -) et de la consommation d'oxygène, en fonction du temps, pour diverses concentrations en acide linoléique*
(1 : 10^{-2} M ; 2 : 0,6 × 10^{-2} M ; 3 : 0,2 × 10^{-2} M)

obtenues pour chaque concentration, traduisent l'évolution de la formation des hydroperoxydes et de la consommation de l'oxygène en fonction du temps. On constate une excellente corrélation entre la formation des doubles liaisons conjuguées et la consommation d'oxygène dans la phase initiale de la réaction. Cependant, lorsque la concentration en oxygène devient très faible, la formation des doubles liaisons conjuguées ne continue pas à croître, mais passe par un maximum puis diminue

légèrement pour atteindre un palier. Tout se passe comme si les hydroperoxydes à doubles liaisons conjuguées se transformaient en milieu anaérobie en d'autres produits qui n'absorbent pas à 234 nm. Cette hypothèse est étayée par les travaux récents de GARSSEN *et al.* (1971). Ces auteurs montrent que la lipoxygénase du soja

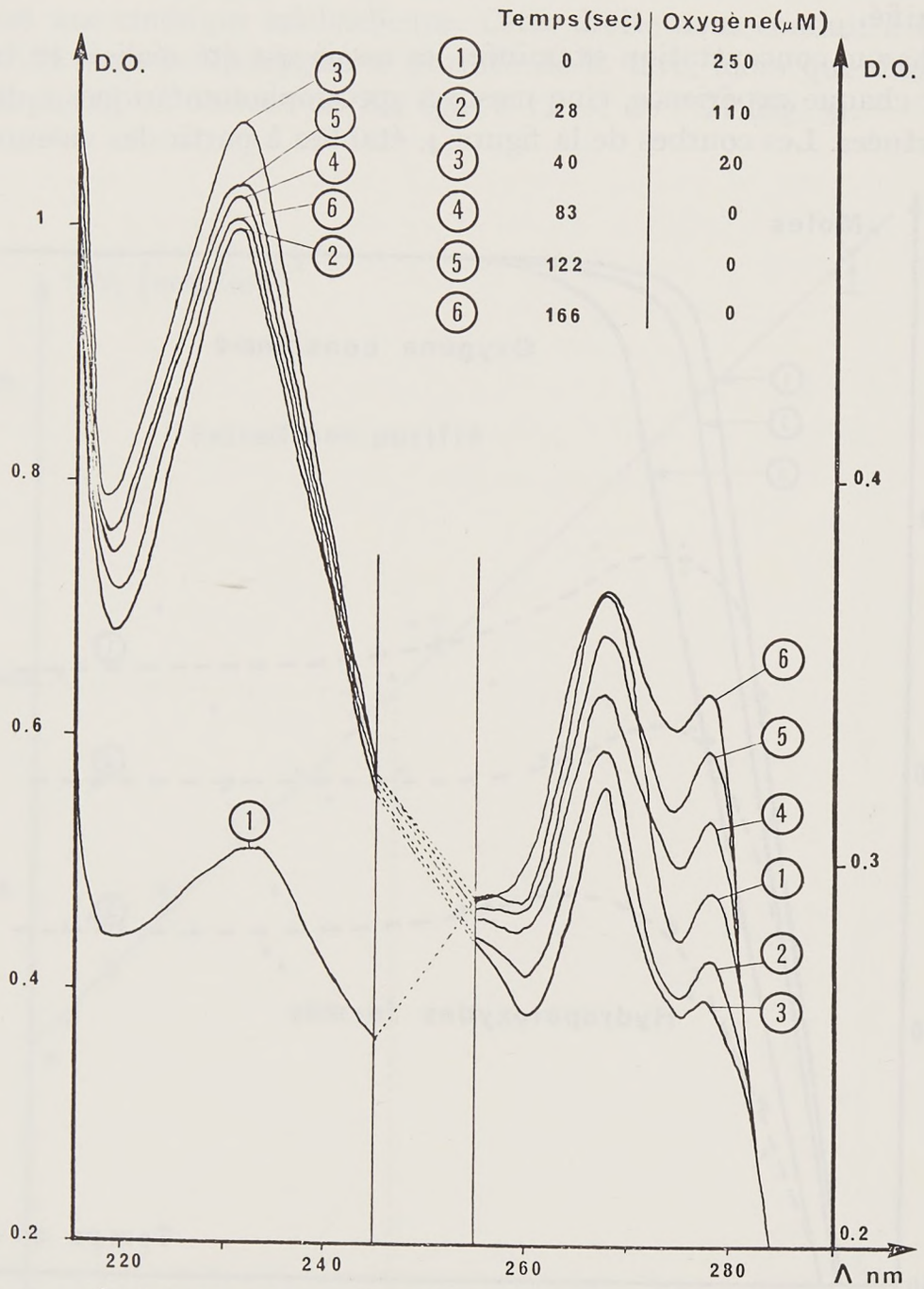


FIG. 5. — *Évolution des spectres dans l'UV des produits de la réaction enzymatique, en fonction du temps, en milieu aérobie puis anaérobie*

provoque, après consommation totale de l'oxygène dissous, la formation de composés présentant un maximum d'absorption à 285 nm. Caractérisés comme provenant de la transformation des hydroperoxydes de l'acide linoléique par déshydratation et scission, ces produits sont :

le 13-oxo-octadéca-*cis*-9, *trans*-11-dièno'ique

$$(CH_3—(CH_2)_4—\underset{\underset{O}{\|}}{C}—CH=CH—CH=CH—(CH_2)_7—COOH)$$

et le 13-oxo-tridéca-*cis*-9, *trans*-11-diènoïque

$$(H-\underset{\underset{O}{\|}}{C}-CH=CH-CH=CH-(CH_2)_7-COOH).$$

Dans le but de vérifier si cette hypothèse s'applique à nos conditions expérimentales, nous avons tracé les spectres d'absorption dans l'ultra-violet des mélanges réactionnels pris à divers temps et à diverses concentrations en oxygène dissous (fig. 5). On observe trois maximums à 278, 268 et 256 nm que l'on peut attribuer à des triènes conjugués, suivant les caractéristiques spectrales indiquées par WOLFF (1968). Ces maximums ne correspondent pas à ceux trouvés par GARSSEN *et al.* (1971), mais ceci peut être dû au fait que les spectres ont été déterminés en milieu aqueux alors que nos mesures ont été faites en milieu éthanol.

Comme le montre la figure 6, où sont portées, en fonction du temps, les varia-

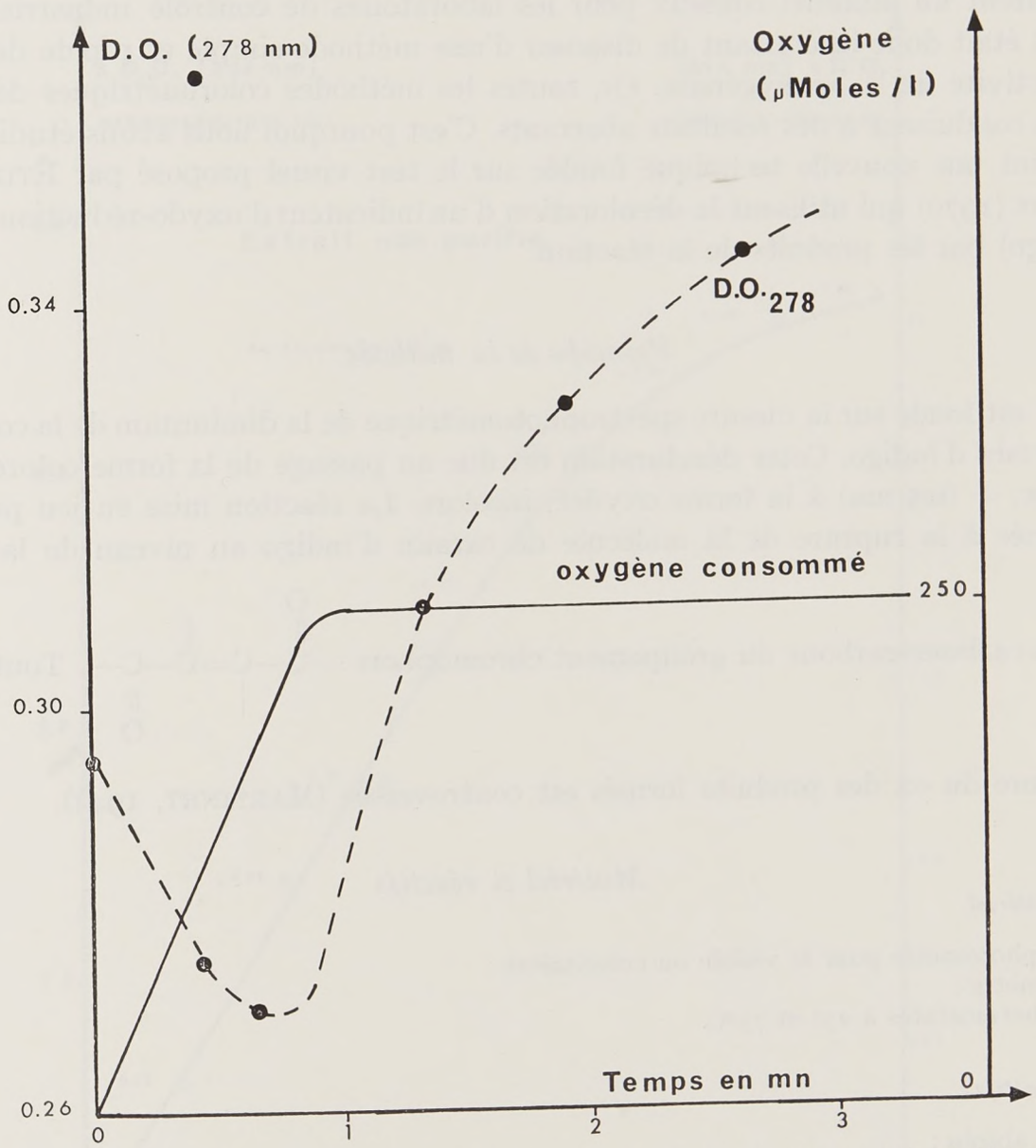


FIG. 6. — *Évolutions comparées de la quantité d'oxygène consommé et de l'absorption à 278 nm*

tions de densité optique à 278 nm et de concentration en oxygène, on observe que cette densité optique diminue jusqu'à consommation totale de l'oxygène pour réaugmenter ensuite et tendre vers un palier.

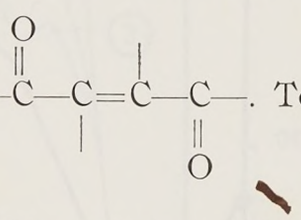
On peut conclure de ces observations que, pour des concentrations suffisamment grandes d'oxygène, il existe une bonne corrélation entre la formation des hydroperoxydes et la consommation d'oxygène dans la phase initiale de la réaction. Quand la concentration en oxygène devient faible, il se produit des réactions secondaires de décomposition des hydroperoxydes qui conduisent à la formation de produits carbonylés présentant plusieurs maximums d'absorption entre 250 et 280 nm.

MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE COLORIMÉTRIQUE DE MESURE DE L'ACTIVITÉ LIPOXYGÉNASIQUE

Comme nous venons de le voir, les méthodes précédentes donnent d'excellents résultats quand elles sont employées dans de bonnes conditions ; cependant, elles nécessitent un matériel coûteux pour les laboratoires de contrôle industriel.

Il était donc intéressant de disposer d'une méthode simple et rapide de dosage de l'activité de la lipoxygénase. Or, toutes les méthodes colorimétriques déjà existantes conduisent à des résultats aberrants. C'est pourquoi nous avons étudié et mis au point une nouvelle technique fondée sur le test visuel proposé par ÉTIENNE et DUBOIS (1970) qui utilisent la décoloration d'un indicateur d'oxydo-réduction (carmin d'indigo) par les produits de la réaction.

Principe de la méthode

Il est fondé sur la mesure spectrophotométrique de la diminution de la coloration du carmin d'indigo. Cette décoloration est due au passage de la forme colorée bleue (λ max. = 615 nm) à la forme oxydée, incolore. La réaction mise en jeu peut être attribuée à la rupture de la molécule de carmin d'indigo au niveau de la double liaison carbone-carbone du groupement chromophore  . Toutefois, la nature du ou des produits formés est controversée (MARTINET, 1942).

Matériel et réactifs

Matériel.

spectrophotomètre pour le visible ou colorimètre ;
chronomètre ;
bains thermostatés à 25° et 75°C.

Réactifs.

éthanol absolu ;
solution d'indicateur coloré : 140 mg de carmin d'indigo [1] et 14 mg de chlorure cuivrique pour 1 litre d'éthanol à 60 p. 100 (V/V) ;
substrat préparé selon SURREY (1964).

[1] Sel disodique de l'acide 5-5′ indigodisulfonique, origine Baker.

Mode opératoire

La réaction enzymatique s'effectue selon la méthode de SURREY (1964), c'est-à-dire dans un milieu où passe un courant d'oxygène.

Chaque prise aliquote de 1 ml du mélange réactionnel est introduite dans 2 ml d'éthanol absolu. Le volume est complété à 10 ml par la solution de carmin d'indigo. Afin d'accélérer la réaction d'oxydation, les tubes sont placés dans un bain à 75°C pendant 20 minutes. Après refroidissement, la densité optique est mesurée à 615 nm en prenant l'éthanol à 60 p. 100 comme référence. La diminution de densité optique par rapport au témoin est portée en fonction du temps sur un graphique.

Pour la comparaison avec la méthode de SURREY, 2 ml du mélange réactionnel sont placés dans 4 ml d'éthanol absolu ; 3 ml sont prélevés et amenés à 10 ml avec de l'éthanol à 60 p. 100 pour doser les doubles liaisons conjuguées à 234 nm ; les 3 ml restants sont complétés à 10 ml par la solution de carmin d'indigo pour mesurer la décoloration due à ces mêmes hydroperoxydes à 615 nm.

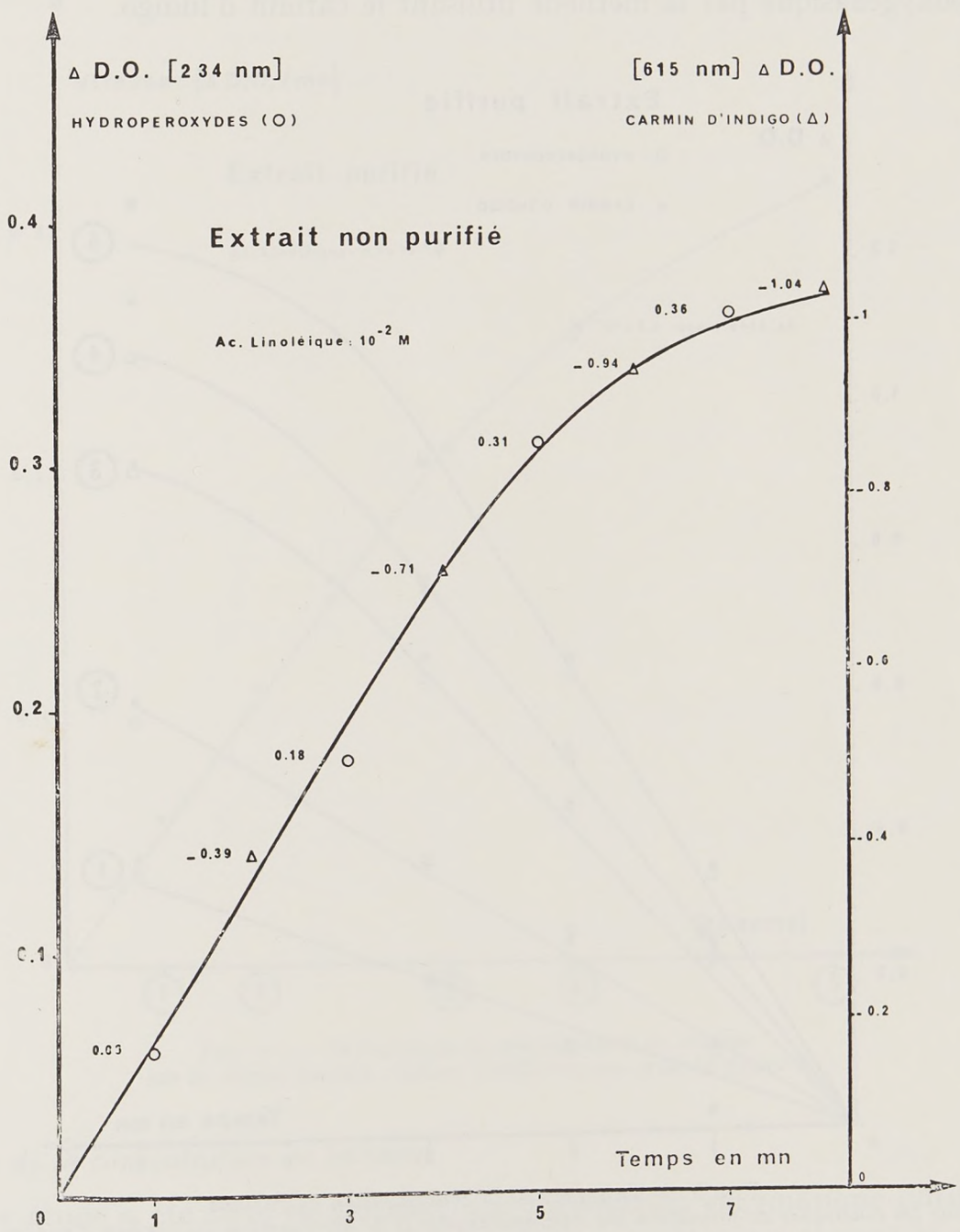


FIG. 7. — *Comparaison de l'augmentation d'absorption à 234 nm et de la diminution d'absorption à 615 nm*

Comparaison des résultats fournis par les deux méthodes (Carmin d'indigo et SURREY)

Évolution de la vitesse de la réaction en fonction du temps.

Cette étude a été faite avec un extrait enzymatique non purifié de farine de fève et un substrat 10^{-2} M en acide linoléique.

Sur la figure 7 sont portées, en fonction du temps, à partir du même mélange réactionnel, l'augmentation de la densité optique à 234 nm au bout de 1, 3, 5, et 7 minutes, ainsi que la diminution de densité optique à 615 nm, pour des temps de 2, 4, 6 et 8 minutes.

On constate une excellente corrélation entre les valeurs obtenues par les deux méthodes. Il en résulte que les autres systèmes oxydo-réducteurs, éventuellement présents dans l'extrait non purifié de fève, n'interfèrent pas dans la mesure de l'activité lipoxygénasique par la méthode utilisant le carmin d'indigo.

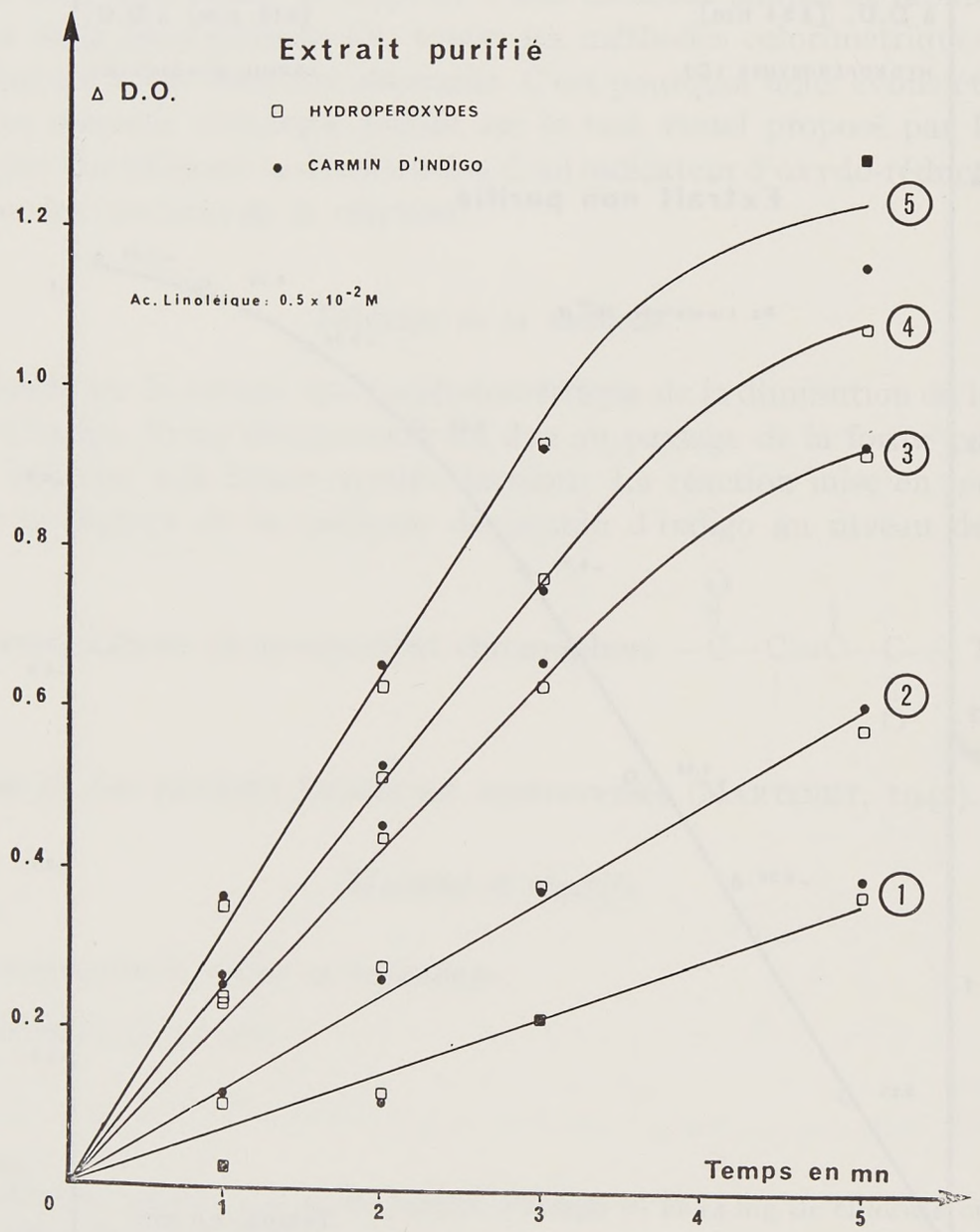


FIG. 8. — *Influence de la concentration en enzyme sur les cinétiques de formation des hydroperoxydes et de décoloration du carmin d'indigo*

Dilution de l'extrait enzymatique purifié	1	2	3	4	5
	40 fois	20 fois	10 fois	7,5 fois	5 fois

Influence de la concentration en enzyme.

Nous avons utilisé pour cette étude un substrat 0,5 × 10^{-2} M en acide linoléique et une préparation enzymatique purifiée, en mettant en œuvre le second mode opératoire décrit précédemment.

L'examen des courbes de la figure 8 où sont portées, en fonction du temps, les variations de densités optiques à 234 nm et 615 nm, montre l'excellente concordance des résultats obtenus par les deux méthodes. Les différentes courbes correspondent à différentes concentrations de préparation enzymatique.

Les vitesses initiales, mesurées sur la figure 8, sont portées en fonction des concentrations en enzyme (fig. 9). On observe que ces vitesses ne sont pas proportionnelles dans toute la gamme de concentrations étudiées. Aux fortes concentrations en enzyme, la concentration en substrat devient limitante.

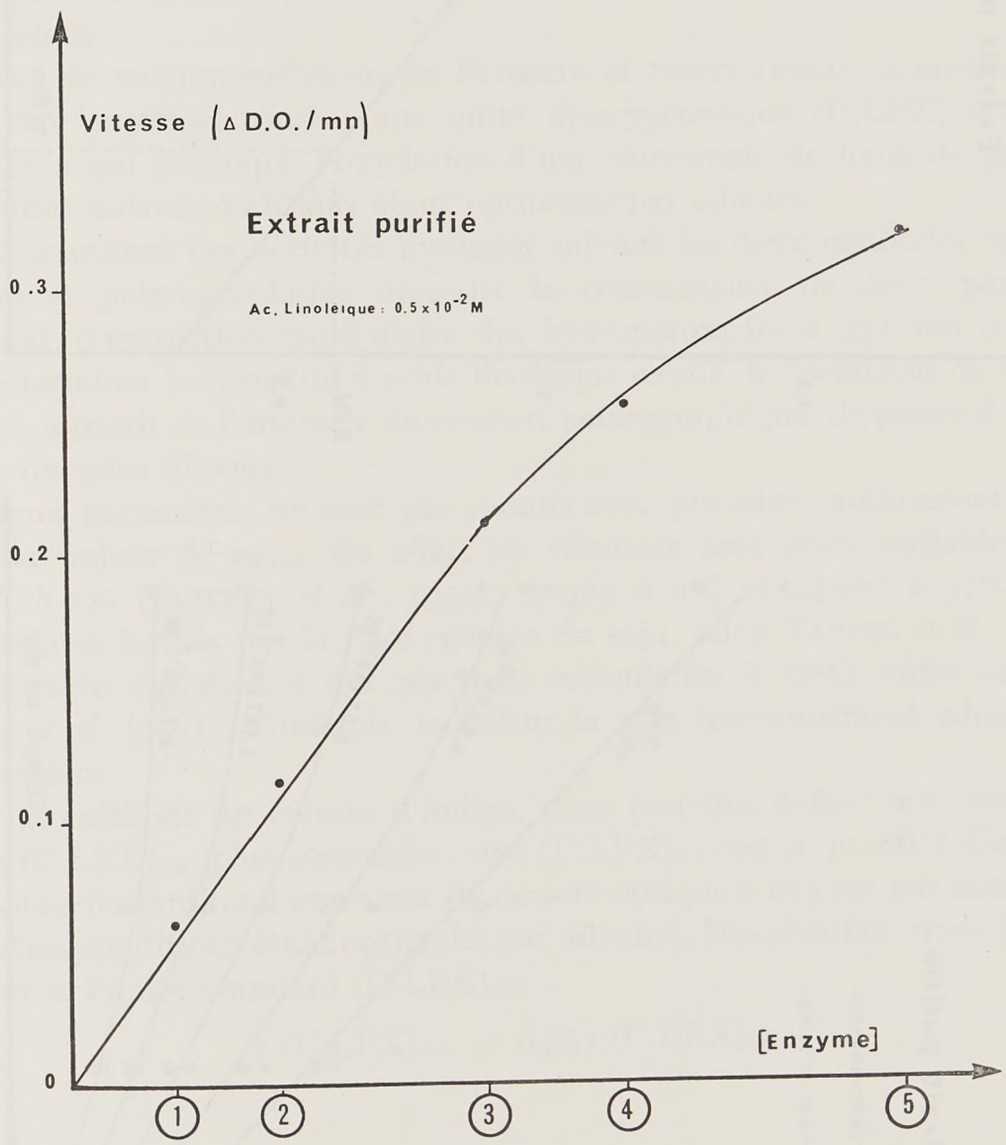


Fig. 9. — *Influence de la concentration en enzyme sur la vitesse initiale ; mêmes conditions que pour la figure 8*

Influence de la concentration en substrat.

Cette étude a été faite en utilisant une préparation enzymatique purifiée. Les concentrations de substrat examinées varient de 10^{-2} M à 0,1 × 10^{-2} M en acide linoléique.

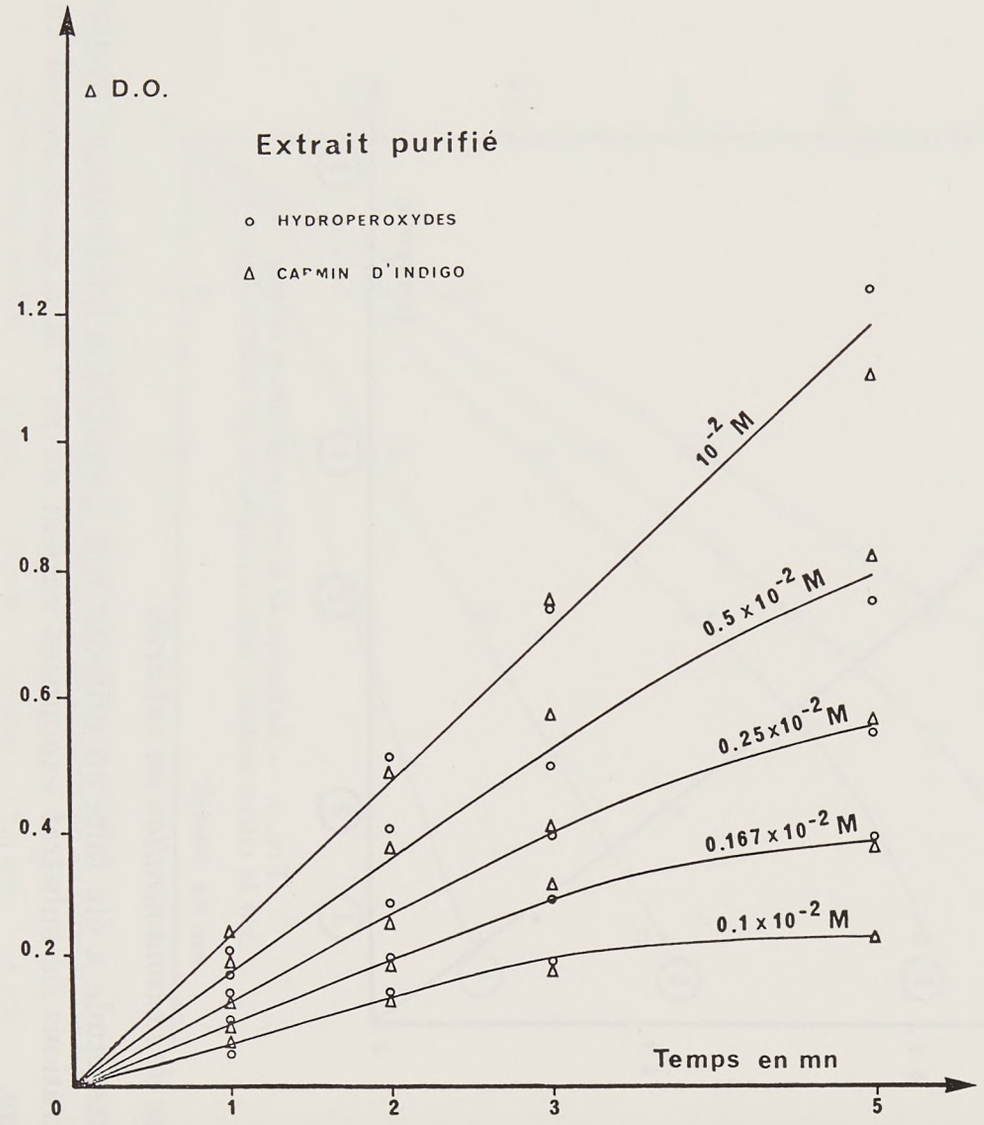


FIG. — 10. *Évolution de l'activité lipoxygénasique en fonction de la concentration en acide linoléique*

o Méthode utilisant le carmin d'indigo
Δ Méthode spectrophotométrique

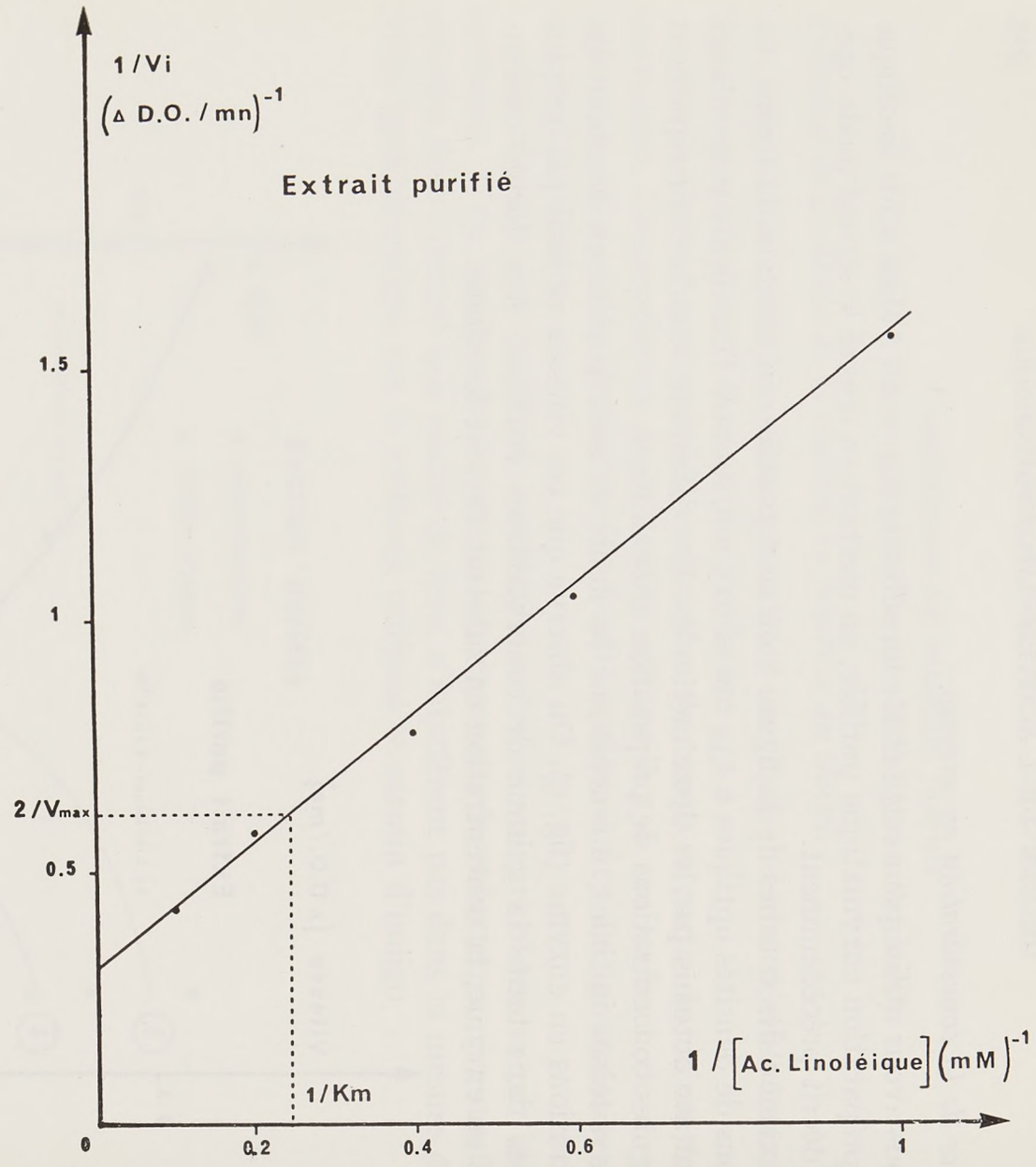


FIG. 11. — *Représentation selon* LINEWEAVER *et* BURK *de la vitesse en fonction de la concentration en acide linoléique*

A partir des courbes obtenues, reportées sur la figure 10, nous avons effectué la transformation de LINEWEAVER et BURK (fig. 11). La droite obtenue traduit une cinétique michaelienne conduisant à une valeur de K_M égale à $4{,}1 \times 10^{-3}$ M.

Cette valeur diffère notablement de celle obtenue précédemment par la méthode polarographique. Ceci est dû au fait que les concentrations initiales en oxygène dissous sont différentes dans les deux cas.

Ainsi, la méthode préconisée fournit des résultats en excellent accord avec ceux donnés par les méthodes étudiées précédemment.

EXPRESSIONS DE L'ACTIVITÉ LIPOXYGÉNASIQUE

Le tableau 2 montre l'extrême diversité des modes d'expression de l'activité lipoxygénasique.

Suivant les recommandations de FLORKIN et STOTZ (1964), la meilleure définition doit être exprimée ainsi : une unité lipoxygénasique (U.LPX) est la quantité d'enzyme qui provoque l'oxydation d'une micromole de linoléate par minute à 25°C (toutes autres conditions étant optimales par ailleurs).

La comparaison des activités mesurées suivant les deux méthodes spectrophotométrique et polarographique nécessite la connaissance de deux paramètres : le coefficient d'extinction moléculaire des hydroperoxydes à 234 nm (ε_{M234}) pour pouvoir déterminer la quantité d'acide linoléique oxydé, le coefficient de conversion qui permet, à partir de l'intensité du courant polarographique, de passer à la concentration en oxygène dissous.

Ces deux paramètres ne sont pas connus avec précision, notamment en ce qui concerne la valeur de ε_{M234}. En effet, les résultats sont assez variables avec les auteurs : 28 000 (PRIVETT *et al.*, 1955), 27 400 à 0°C et 23 000 à 37°C pour les hydroperoxydes formés par la lipoxygénase du soja, selon TAPPEL *et al.* (1953) qui attribuent cette variation à des réactions secondaires à 37°C, enfin 24 500 pour JOHNSTON *et al.* (1961). Toutefois, la valeur la plus communément admise semble être la première.

Pour la méthode au carmin d'indigo, nous pouvons définir une unité lipoxygénasique $(U.LPX)_{c.i.}$ plus commode : une $(U.LPX)_{c.i.}$ est la quantité d'enzyme qui provoque une diminution d'une unité de densité optique à 615 nm par minute à 25°C (toutes autres conditions étant optimales par ailleurs). Nos résultats nous permettent de la relier à l'unité standard $(U.LPX)_{réf.}$

$$1\ (U.LPX)_{c.i.} = 0{,}357\ (U.LPX)_{réf.}$$

CONCLUSION

Cette étude nous a permis de retenir deux méthodes de mesure de l'activité lipoxygénasique parmi celles utilisées jusqu'à présent : l'une consiste à mesurer par polarographie la quantité d'oxygène consommée, l'autre fait intervenir la mesure des hydroperoxydes formés par l'intermédiaire du dosage spectrophotométrique des doubles liaisons conjuguées.

Méthode spectrophotométrique

Ces deux méthodes sont particulièrement adaptées pour l'étude de la réaction enzymatique et peuvent servir de référence pour d'autres méthodes plus rapides et plus pratiques. C'est ainsi qu'en utilisant la méthode spectrophotométrique comme référence, nous avons pu mettre au point une technique de dosage de l'activité lipoxygénasique plus pratique et plus accessible aux laboratoires de contrôle industriel.

SUMMARY

LIPOXYGENASE ACTIVITY ASSAYS. DEVELOPMENT OF A NEW COLORIMETRIC METHOD

From the experimental critical study of the various methods for measuring lipoxygenase activity, only two of them appeared to be particularly well suitable because of their specificity. One consists in polarographic assay of oxygen uptake ; the other involves the measurement of the quantity of hydroperoxydes formed, by means of spectrophotometric assay of the conjugated double bonds. Both methods give comparable results when the conditions of the medium are strictly respected (state and concentration of the substrate, pH, ionic strength, temperature, oxygen concentration). They can be regarded as basic methods and can be used as a reference for other more practical methods. This study develops a new method which is more suitable for industrial control laboratories. The method, involving the oxidation of indigo carmin in a colourless compound, only needs a simple colorimeter. Results given by this colorimetric method are comparable to those obtained by the reference methods even for low activities.

ZUSAMMENFASSUNG

METHODEN ZUR BESTIMMUNG DER LIPOXYGENASEAKTIVITÄT. VORSCHLAG FÜR EINE NEUE METHODE

Ein kritisches Studium der verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Lipoxygenaseaktivität hat ergeben, dass nur zwei Methoden auf grund ihrer Spezifizität gut geeignet sind. Die eine beruht auf der polarographischen Messung der verbrauchten Sauerstoffmenge, die andere bestimmt die gebildete Hydroperoxydmenge über die spektrophotometrische Bestimmung der Doppelbindungen. Beide Betimmungen führen zu vergleichbaren Resultaten, unter der Voraussicht, dass die Bedingungen für das Substrat (Konzentration, pH, Ionenkraft, Temperatur, Gehalt an löslichem Sauerstoff) genauestens eingehalten werden. Sie können als grundlegende Methoden betrachtet werden und als Referenz für andere, schnellere und praktischere Methoden dienen. Die Untersuchungen haben dazu geführt, eine neue Methode zu entwickeln, die leichter in einem Industriekontrollabor durchgeführt werden kann. Ein einfaches Colorimeter genügt, um die Oxydation von Indigocarmin zu einem farblosen Komponenten zu messen. Sie ermöglicht die Bestimmung von schwachen Aktivitäten und die Ergebnisse sind mit denen der Referenz methoden vergleichbar.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André E., Hou K. W., 1932. Sur la présence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja. *C. R. Acad. Sci.*, **194**, 645-647.

Balls A. K., Axelrod B., Kies M. W., 1943. Soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.*, **149**, 491-504.

Beaux Y., 1970. Thèse de docteur-ingénieur soutenue le 5-6-70 à la faculté de Sciences de Paris. N° d'enregistrement au C. N. R. S. : A. O. 4554.

Ben Aziz A., Grossman S., Ascarelli I., Budoswki P., 1970. Linoleate oxidation induced by lipoxygenase and heme proteins. A direct spectrophotometric assay. *Anal. Biochem.*, **34**, 88-100.

Dillard M. G., Henick A. S., Koch R. B., 1960. Unsaturated triglyceride and fatty acid lipoxidase activities of navy beans, small red beans, peanuts, green peas and lima beans. *Food Res.*, **25**, 544-553.

Dillard M. G., Henick A. S., Koch R. B., 1961. Differences in reactivity of legume lipoxidases. *J. Biol. Chem.*, (236), 37-40.

Étienne J.-J., Dubois M., 1970. Étude du rôle de la farine de fève (*Vicia faba* L.) en technologie de la panification : intervention de la lipoxygénase dans le blanchiment exagéré des pâtes et dans la dégradation de la flaveur du pain. *Rapport D. G. R. S. T.* n° 68-01-228-00-212-75-01.

Florkin M., Stotz E. H., 1964. *Comprehensive biochemistry*, vol. 13, 2nd ed., 7. Elsevier Publishing Cy, Amsterdam.

Galliard T., Phillips D. R., 1971. Lipoxygenase from potato tubers, partial purification and properties of an enzyme that specifically oxygenates the 9-position of linoleic acid. *Biochem. J.*, (124), 431-438.

Gardner H. W., Weisleder D., 1970. Lipoxygenase from Zea mays : 9-D-hydroperoxy-*trans*-10, *cis*-12-octadecadienoic acid from linoleic acid. *Lipids* (5), 678-683.

Garssen G. J., Vliegenthart J. F. G., Boldingh J., 1971. An anaerobic reaction between lipoxygenase, linoleic acid and its hydroperoxides. *Biochem. J.*, **122**, 327-332.

Grosch W., 1968. Linol-und Linolensaure als Substrate für die enzymatische Bildung flüchtiger Carbonylverbindungen in Erbsen. *Z. Lebens. Untersuch. u. Forsch.*, **137**, 216-223.

Grossman S., Ben Aziz A., Budowski P., Ascarelli I., Gertler A., Birk Y., Bondi A., 1969. Enzymic oxidation of carotene and linoleate by alfalfa ; extraction and separation of active fractions. *Phytochem.*, **8**, 2287-2293.

Grossman S., Trop M., Avtalion R., Pinsky A., 1972. Egg plant lipoxygenase : isolation and partial characterization. *Lipids*, **7**, 467-473.

Haining J. L., Axelrod B., 1958. Induction period in the lipoxidase-catalyzed oxidation of linoleic acid and its abolition by substrate peroxide. *J. Biol. Chem.*, **232**, 193-202.

Hamberg M., Samuelsson B., 1967. On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.*, **242**, 5329-5335.

Irvine G. N., Anderson J. A., 1953. Kinetic studies of the lipoxidase system in wheat. *Cereal Chem.*, **30**, 247-255.

Johnston A. E., Zilch K. T., Selke E., Dutton H. J., 1961. Analysis of fat acid oxidation products by countercurrent distribution methods. V. Low-temperature decomposition of methyl linoleate hydroperoxide. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **38**, 367-371.

Kies M. W., Haining J. L., Pistorius E., Schroeder D. H., Axelrod B., 1969. On the question of the identity of soybean lipoxidase and carotene oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 312-315.

Koch R. B., Stern B., Ferrari C. G., 1958. Linoleic acid and trilinolein as substrates for soybean lipoxidase. *Arch. Biophys.*, **78**, 165-179.

Koch R. B., Brumfiel B. L., Brumfiel M. N., 1971. Calcium requirement for lipoxygenase catalyzed linoleate oxidation. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **48**, 532-538.

Lea C. H., 1962. In Schultz H. W., Day E. A., Sinnhuber R. O., *Symposium on foods : lipids and their oxidation*, 3-28, The Avi Publishing Company, Inc., Wesport.

Martinet J., 1942. In Grignard V., *Traité de Chimie organique*, tome 19, Masson, éd., Paris.

Mitsuda H., Yasumoto K., Yamamoto A., Kusano T., 1967. Study on soybean lipoxygenase. I. Preparation of cristalline enzyme and assay by polarographic method. *Agric. Biol. Chem.*, **31**, 115-118.

Privett O. S., Nickell C., Lundberg W. O., Boyer P. D., 1955. Products of the lipoxidase catalyzed oxidation of sodium linoleate. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **32**, 505-511.

Rohrlich M., Ziehmann G., Lenschau R., 1959. Die Anwendung des elektrochemischen Messverfahrens nach Tödt zur Bestimmung der Lipoxydase und Katalase im Getreide. *Getreide u. Mehl*, **9**, 13-18.

Roubal W. T., Tappel A. L., 1966. Damage to proteins, enzymes and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 5-8.

Siddiqi A. M., Tappel A. L., 1956. Catalysis of linoleate oxidation by pea lipoxidase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **60**, 91-99.

Smith W. L., Lands W. E. M., 1970. The self-catalyzed destruction of lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **41**, 846-851.

Smith W. L., Lands W. E. M., 1972. Oxygenation of unsaturated fatty acids by soybean lipoxygenase. *J. Biol. Chem.*, **247**, 1038-1047.

Sumner J. B., Sumner R. J., 1940. The coupled oxidation of carotene and fat by carotene oxidase. *J. Biol. Chem.*, **134**, 531-533.

Surrey K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

Tappel A. L., Boyer P. D., Lundberg W. O., 1953. The reaction mechanism of soybean lipoxidase. *J. Biol. Chem.*, **199**, 267-281.

Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G., Boldingh J., 1970. Proof of the enzymatic formation of 9-hydroperoxy-10-*trans*, 12-*cis*-octadecadienoic acid from linoleic acid by soya lipoxygenase. *Biochim. Biophys. Acta*, **202**, 198-199.

Veldink G. A., Garssen G. J., Vliegenthart J. F., Boldingh J., 1972. Positionnal specificity of corn germ lipoxygenase as a function of pH. *Biochem. Res. Commun.*, **47**, 22-26.

Winkler, 1955. In *Amer. Public Health assoc., Standard Methods of examination of water and sewage*, 10th edition.

Wolff J. P., 1968. *Manuel d'analyse des corsp gras*. Azoulay éd., 27-35, Paris.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 309-321.

ISOLEMENT ET QUELQUES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA LIPOXYGÉNASE DE LA FÈVE (*VICIA FABA* L.) (1)

Y. BEAUX et R. DRAPRON

Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert, 91305 Massy

RÉSUMÉ

La lipoxygénase de la fève a été obtenue à l'état pur et cristallisé, à la suite des traitements suivants : extraction à pH 4,5, précipitation par le sulfate d'ammonium, filtration sur gel de dextrane G-200 et chromatographie d'échange d'ions sur C. M. Sephadex C-50.

La préparation s'est révélée homogène par les techniques d'ultra-centrifugation et de « disc-électrophorèse ».

Sa masse moléculaire, déterminée par filtration sur gel, se situe aux environs de 88 000.

La composition en acides aminés et son taux d'hydrophobicité permettent de penser qu'il existe une forte proportion de liaisons hydrophobes dans la molécule.

La température optimale d'action à pH 7 est de l'ordre de 25°C. Encore active à — 20°C, elle est totalement inactivée à 50°C environ.

Le pH optimal d'action est situé à 6,8 pour la température de 25°C, les pH d'inactivation étant au voisinage de 5 et de 9.

Le BHT se comporte comme un inhibiteur vrai de l'action enzymatique et non comme un antioxygène classique.

Un traitement thermique de la farine de fève pendant 10 mn à 105°C ou de 1 heure à 100°C inactive totalement la lipoxygénase.

INTRODUCTION

Depuis sa découverte par André et Hou (1932), à partir du soja, la lipoxygénase a été identifiée dans de nombreux produits végétaux, les graines de légumineuses en étant particulièrement riches (Tappel, 1961). Ainsi, si l'on prend le soja comme

(1) Travail recouvrant en partie, la thèse de Docteur-Ingénieur présentée à la Faculté des Sciences de Paris par Y. Beaux. N° C. N. R. S. : 4554.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-135-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

base de comparaison avec une activité lipoxygénasique égale à 100, les activités de la fève et du pois varient de 40 à 60, celles du blé et de l'orge de 0,5 à 15. Aussi, l'isolement de la lipoxygénase, l'étude de ses caractéristiques physicochimiques et du mécanisme de son action ont été réalisés à partir du soja principalement et du pois.

A notre connaissance, aucune tentative n'a été effectuée pour isoler et étudier les caractéristiques de la lipoxygénase de la fève (*Vicia faba* L.), bien que celle-ci se trouve impliquée dans divers domaines de la technologie, et plus particulièrement dans celui de la panification. Le travail présenté ici a donc porté sur l'extraction et la purification de la lipoxygénase de la fève ainsi que sur l'examen de quelques-unes de ses caractéristiques physico-chimiques.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Source enzymatique

Farine de fève obtenue par mouture industrielle d'un lot de graines en provenance d'Égypte dont les principales caractéristiques analytiques sont indiquées dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Principales caractéristiques analytiques de la farine de fève
(les valeurs indiquées sont rapportées en g pour 100 g de substance sèche)

Eau	10,85
Matières minérales	3,08
Protéines totales (N × 6,25)	34,30
Protéines solubles dans une solution de K_2SO_4 à 5 p. 100	27,30 (79,6 p. 100 des protéines totales)
Lipides extraits à l'hexane	2,16
Glucides solubles dans l'éthanol à 95°GL bouillant	4,00
Activité lipoxygénasique (U.LPX/g)	160

Détermination de l'activité lipoxygénasique

Elle a été effectuée selon la méthode spectrophotométrique de Surrey (1964) décrite précédemment par Nicolas. Cette méthode a été adaptée à la mesure de l'activité à des températures inférieures à 0°C. La succession des opérations est alors la suivante : mélanger l'extrait enzymatique et le mélange réactionnel préalablement amenés à + 2°C environ, homogénéiser rapidement la solution ; congeler immédiatement, le plus rapidement possible, le mélange et l'amener à la température d'incubation choisie ; après un temps déterminé, décongeler très vite le mélange réactionnel et en prélever une partie aliquote qui est immédiatement transférée dans de l'éthanol à 96° GL pour bloquer la réaction, puis procéder selon le mode opératoire décrit par Surrey pour mesurer la quantité d'hydroperoxydes formés. Il est nécessaire de réaliser un essai témoin dans les mêmes conditions pour une durée d'incubation nulle, de façon à tenir compte de l'action enzymatique qui a pu se produire pendant les périodes de congélation et de décongélation.

Techniques de séparations chromatographiques

Nous avons employé successivement :

— la filtration sur gel de dextrane Sephadex G-200 dont le domaine de fractionnement, pour les peptides et les protéines globulaires, correspond à des masses moléculaires de 5 000 à 800 000 ;

— l'échange d'ions avec un échangeur cationique, le carboxy-méthyl Sephadex C-50 ; à pH 5,5 la protéine enzymatique possédant un léger excès de charges positives se trouve retenue par ce gel tant que la force ionique reste faible ;

— l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (disc-électrophorèse) selon le principe décrit par BLOEMENDAL (1963)

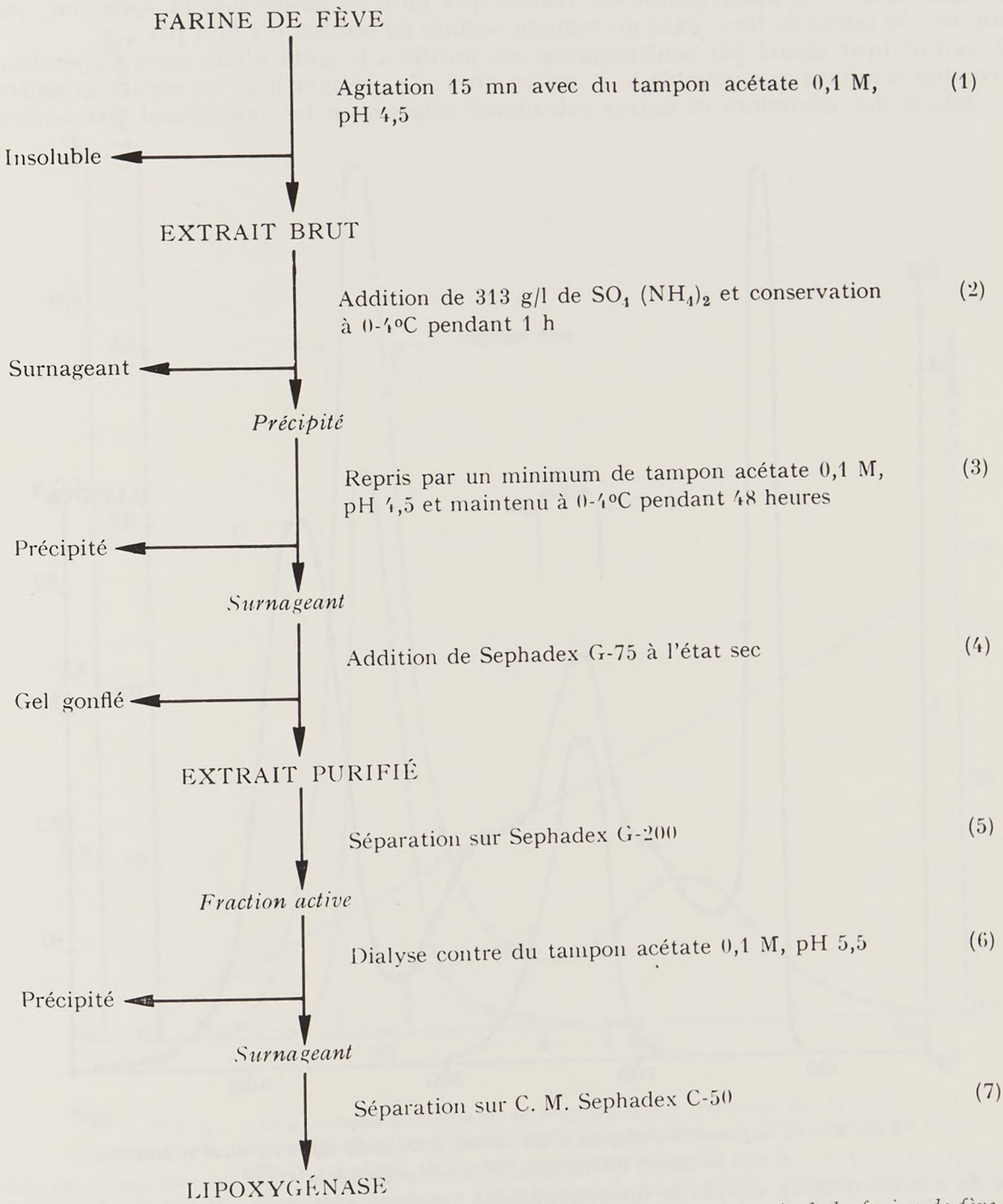


FIG. 1. — *Schéma du processus d'isolement de la lipoxygénase à partir de la farine de fève*

Dosage des protéines et des acides aminés totaux

La teneur en protéines des différents extraits enzymatiques est estimée par la méthode colorimétrique de Lowry *et al.* (1951).

Le dosage des acides aminés totaux, après hydrolyse acide de la protéine enzymatique isolée, est effectué à l'aide d'un analyseur automatique Technicon.

Extraction et purification de l'enzyme

Nous avons représenté sur la figure 1 le schéma du processus de purification, retenu après de nombreux essais.

Il comprend trois étapes principales : l'extraction de l'enzyme (opération 1) ; la purification de l'extrait brut obtenu (opérations 2, 3, 4), puis deux fractionnements de cet extrait purifié visant à séparer l'enzyme des autres constituants protéiques encore présents (opérations 5, 6, 7).

L'extraction de la lipoxygénase est réalisée par mise en suspension et agitation, pendant 15 minutes, de farine de fève, dans un tampon acétate de sodium 0,1 M à pH 4,5.

L'extrait brut séparé par centrifugation est purifié à la suite d'une série d'opérations qui sont conduites autant que possible à + 4°C environ. En premier lieu, on sépare grossièrement les globulines des albumines et autres substances solubles en les précipitant par addition de

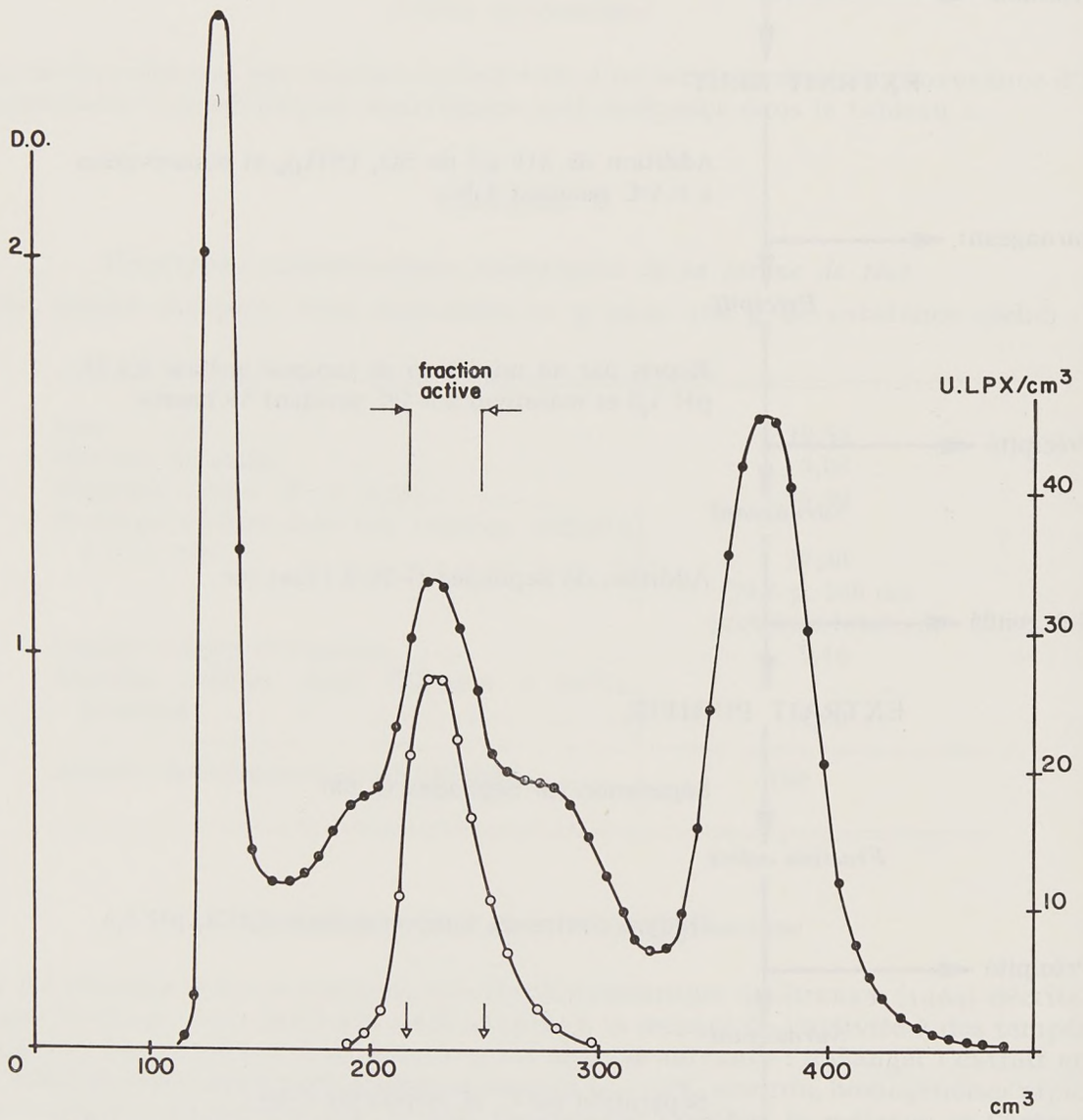


Fig. 2. — *Diagramme d'élution d'un extrait purifié de lipoxygénase soumis à une filtration analytique sur gel de Sephadex G-200*

Colonne de 100 cm de long, 2,5 cm de diamètre. Éluant : tampon acétate 0,1 M pH 4,5. Température : 0-4°C. Débit 10 ml/h.

●——● Densité optique à 278 nm.
○——○ Activité lipoxygénasique.

sulfate d'ammonium. Le précipité actif est redissous dans le même tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 4,5 puis laissé à + 4°C pendant 48 heures, ce qui provoque la précipitation d'une partie des protéines de masses moléculaires élevées, que l'on élimine par centrifugation. Enfin, une addition de gel de dextrane Sephadex G-75, à l'état sec, permet à la fois de concentrer l'extrait et d'éliminer une partie importante de petites molécules (sels, pigments, peptides et protéines de faibles masses moléculaires).

L'extrait purifié ainsi préparé est alors soumis à un premier fractionnement par filtration sur gel Sephadex G-200, le tampon utilisé étant l'acétate de sodium 0,1 M, pH 4,5. La figure 2 représente le diagramme d'élution obtenu dans le cas d'un fractionnement à l'échelle analytique. Au pic principal de protéines, situé dans le domaine de séparation vraie du gel, correspond l'activité enzymatique. La partie centrale de ce pic constitue la fraction active qui sera soumise à la séparation suivante. Auparavant, il est nécessaire d'ajuster le pH de cette solution à 5,5 par dialyse lente à 4°C, au moyen du tampon acétate, afin que l'échangeur cationique utilisé remplisse son rôle. En effet, dans ces conditions de pH et de force ionique, la protéine enzymatique reste fixée sur le gel alors que les protéines anioniques et très faiblement cationiques sont éluées. La figure 3 montre qu'après cette élution un gradient salin approprié permet de faire apparaître

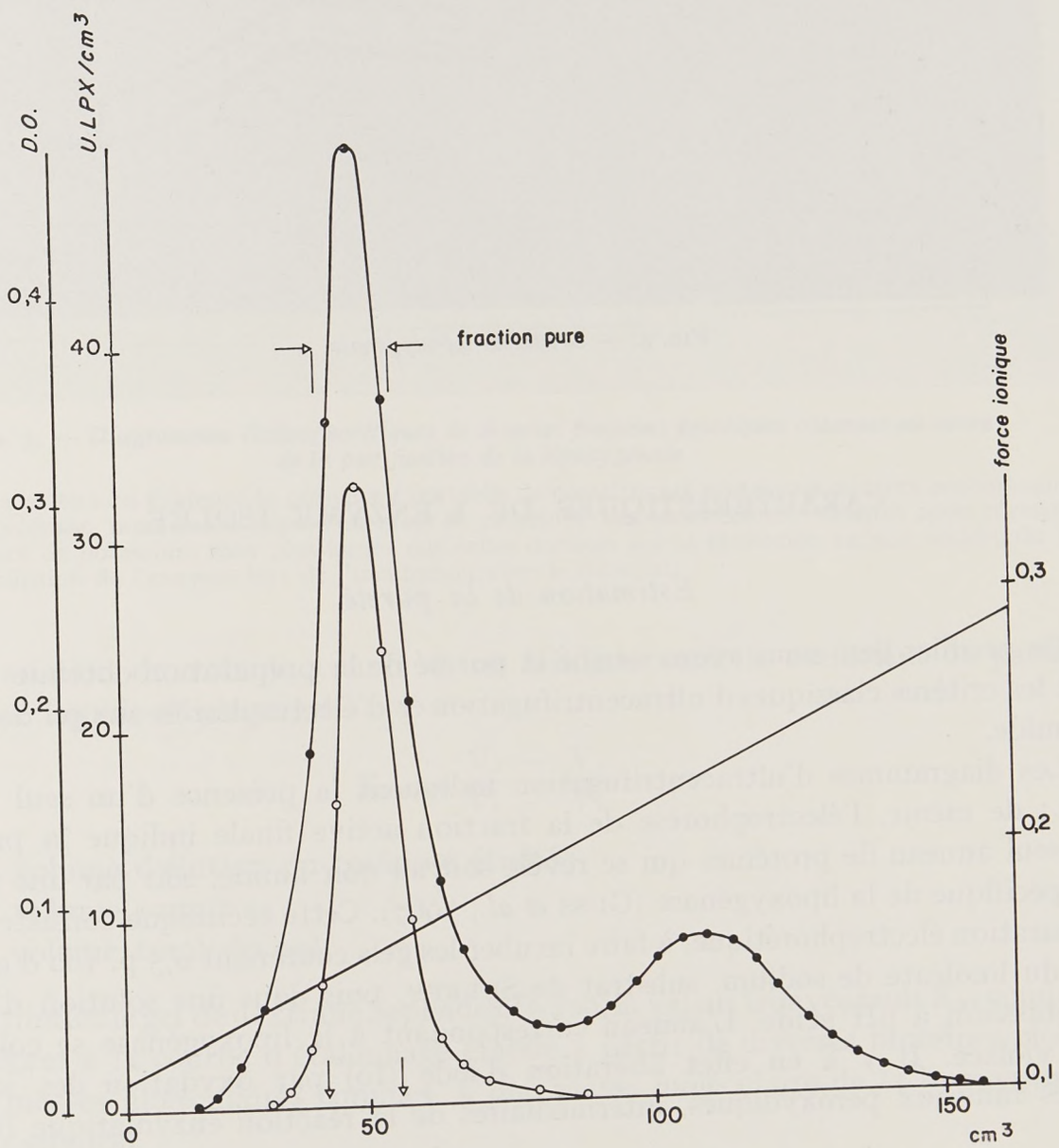


FIG. 3. — *Diagramme d'élution de la fraction active* (obtenue sur G-200) *soumise à une chromatographie analytique par échange d'ions sur C. M. Sephadex C-50*

Colonne de 20 cm de long, 1,8 cm de diamètre. Élution par un gradient linéaire de force ionique (tampon acétate 0,1 M pH 5,5, force ionique de 0,1 à 0,3 par addition de NaCl). Température : 0-4°C. Débit : 5 ml/h.

●———● Densité optique à 278 nm.
○———○ Activité lipoxygénasique

deux pics de protéines, dont le plus important coïncide exactement avec l'activité lipoxygénasique. Ce pic constitue la fraction pure de lipoxygénase.

La protéine contenue dans cette fraction pure peut être obtenue sous forme cristalline. La figure 4 montre, à titre d'exemple, un cristal obtenu par dialyse lente à 4°C contre une solution de sulfate d'ammonium. Ces fines lames se forment par syncristallisation de la protéine avec le sulfate d'ammonium. Ceci ne constitue pas une preuve de pureté de la préparation ; en outre, l'aspect des cristaux obtenus peut varier suivant les conditions opératoires.

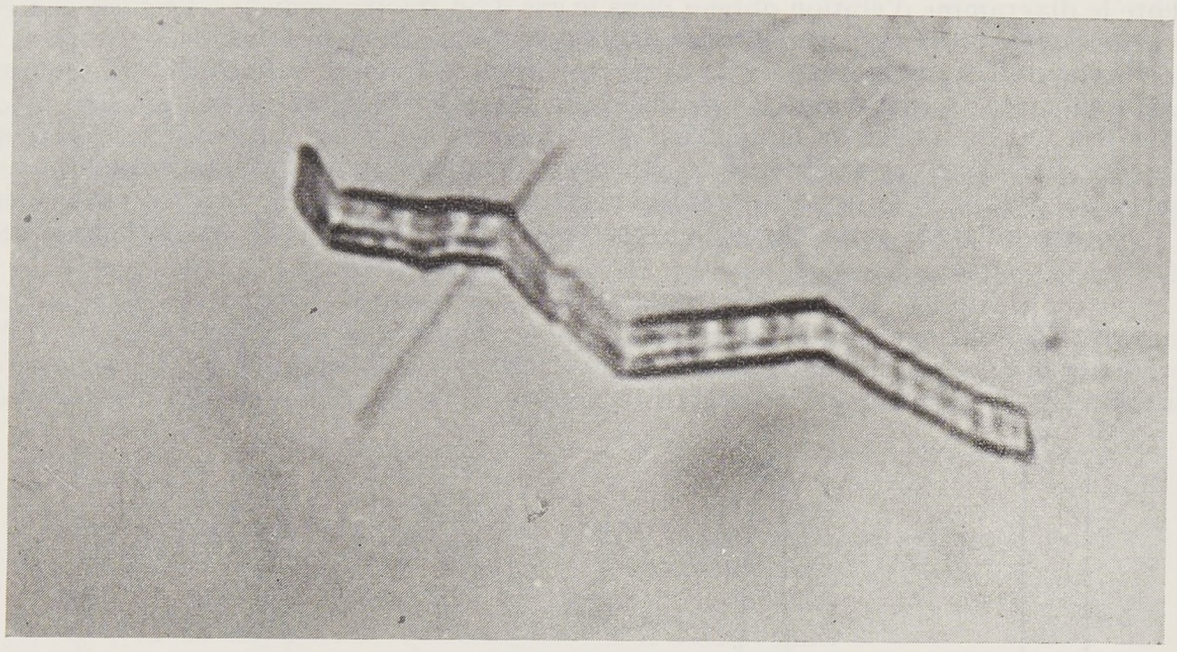


FIG. 4. — *Cristal de lipoxygénase*

CARACTÉRISTIQUES DE L'ENZYME ISOLÉE

Estimation de la pureté

En premier lieu, nous avons vérifié la pureté de la préparation obtenue en utilisant les critères classiques d'ultracentrifugation et d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

Les diagrammes d'ultracentrifugation indiquent la présence d'un seul constituant ; de même, l'électrophorèse de la fraction active finale indique la présence d'un seul anneau de protéines qui se révèle soit au noir amide, soit par une technique spécifique de la lipoxygénase (GUSS *et al.*, 1967). Cette technique consiste, après la séparation électrophorétique, à faire incuber les gels contenant 0,5 p. 100 d'amidon dans du linoléate de sodium, substrat de SURREY, puis dans une solution d'iodure de potassium à pH acide. L'anneau correspondant à la lipoxygénase se colore en brun violacé. Il y a en effet libération d'iode (Io) par oxydation des ions I^- par les radicaux peroxydiques, intermédiaires de la réaction enzymatique (fig. 5).

Détermination de la masse moléculaire

On peut en effectuer une estimation par la technique de filtration sur gel, le volume d'élution d'une protéine étant sensiblement proportionnel au logarithme de sa masse moléculaire. Pour éliminer les erreurs dues à la variation de compacité

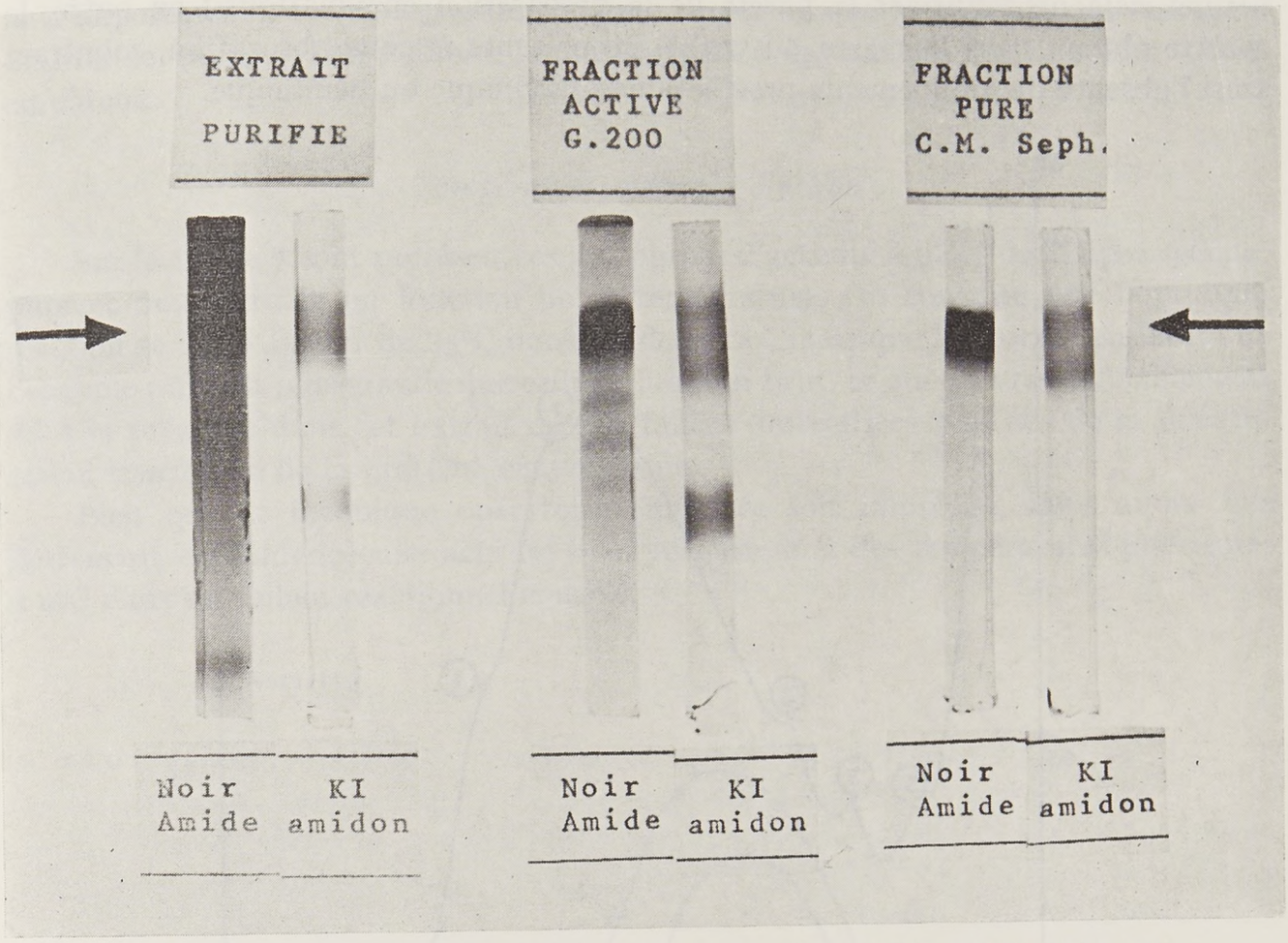


FIG. 5. — *Diagrammes électrophorétiques de diverses fractions protéiques obtenues au cours de la purification de la lipoxygénase*

De manière à mettre en évidence la présence éventuelle de constituants protéiques mineurs accompagnant la lipoxygénase, nous avons déposé un excès de protéines. Les zones colorées obtenus après révélation à l'iodure de potassium sont plus larges que celles données par la révélation au noir amide, du fait de la diffusion de l'enzyme lors de l'incubation avec le substrat.

du gel (variation du volume « mort »), on fait intervenir le coefficient de partage entre phase liquide et phase gel :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

où V_e : volume d'élution du composé étudié ;
V_o : volume « mort » ;
V_t : volume total du gel.

En utilisant le gel de dextrane Sephadex G-200, la valeur trouvée pour K_{av} conduit, en se référant à la courbe d'étalonnage établie à partir de diverses protéines globulaires de masses moléculaires connues, à une masse moléculaire de la lipoxygénase de 88 000 environ.

Composition en acides aminés

La figure 6 représente le spectre d'absorption de l'enzyme pure dans l'ultra-violet. Ce spectre est partiellement résolu ; on y observe en effet les maximums d'absorption des acides aminés aromatiques : tryptophane, tyrosine et phénylalanine. Ceci

permet déjà de confirmer la pureté de la préparation enzymatique ; en outre, le spectre obtenu dans la région du visible ne présente aucune absorption, montrant ainsi l'absence de groupements prosthétiques, flavinique ou héminique.

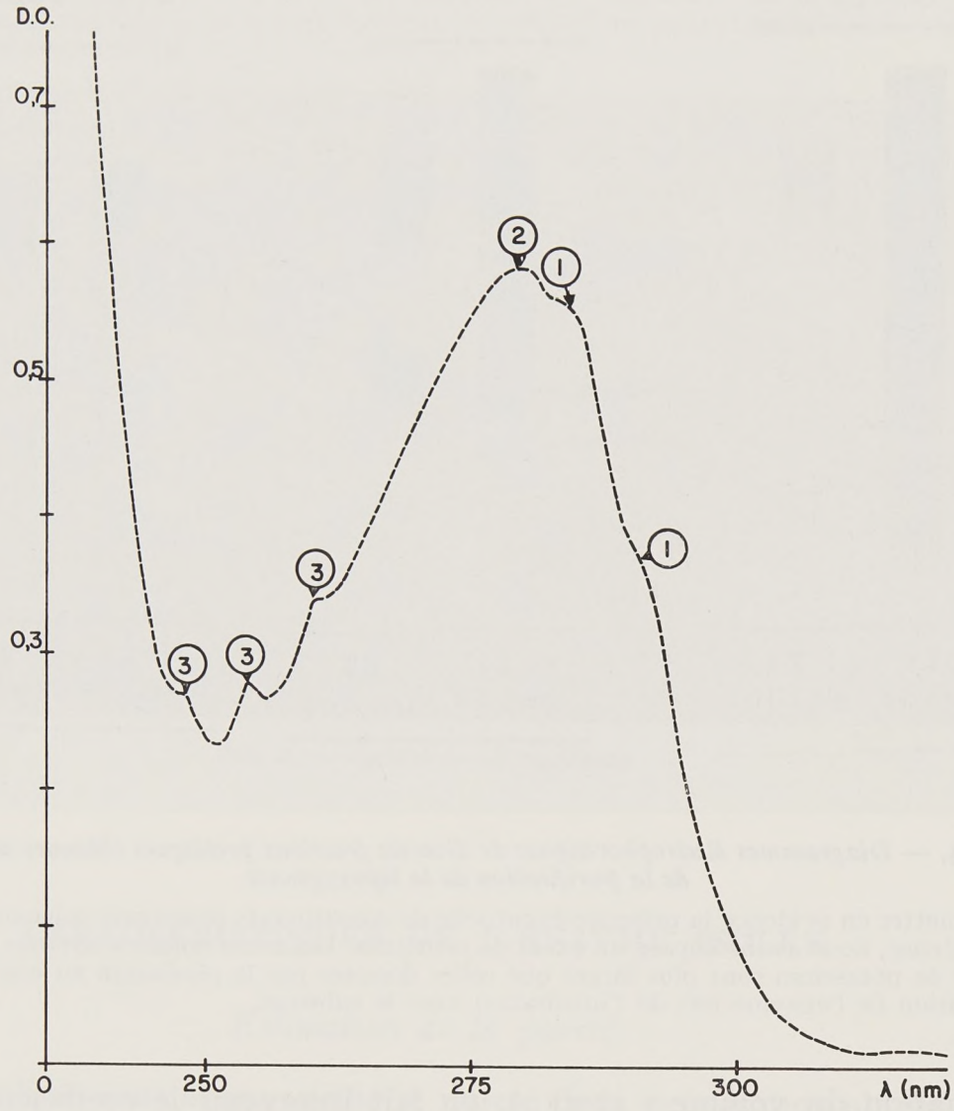


FIG. 6. — *Spectre d'absorption dans l'ultra-violet d'une fraction pure de lipoxygénase* (après chromatographie par échange d'ions). Ce spectre, partiellement résolu, comporte les deux épaulements caractéristiques du tryptophane (1), le maximum de la tyrosine (2) et les trois maximums de la phénylalanine (3).

Dans son ensemble, la composition en acides aminés n'est pas caractéristique d'un type donné de protéine ; par contre, nous avons constaté une faible teneur en acides aminés soufrés. Cela peut être relié au fait que les agents réagissant avec les groupements SH (parachloromercuribenzoate et N-éthylmaléimide) n'ont aucun effet inhibiteur vis-à-vis de l'activité lipoxygénasique.

Les proportions relatives en différents acides aminés permettent de prévoir l'existence d'une forte proportion de liaisons hydrophobes participant au maintien de la structure de la molécule protéique. Ceci devrait conférer à la lipoxygénase une certaine résistance vis-à-vis d'une dénaturation de type hydro-thermique, ce qui a pu être vérifié, comme nous le verrons plus loin. Il est également possible d'imaginer que cet excès de groupements apolaires dans la molécule enzymatique traduit l'existence d'un site apolaire de fixation du substrat. Cette hypothèse, déjà émise pour d'autres raisons, aborde le très intéressant problème de l'activité de cette enzyme hydrophile vis-à-vis d'un substrat hydrophobe, problème d'autant

plus important en technologie des produits céréaliers que la mobilité des réactants est limitée, puisque l'on a affaire le plus souvent à des milieux peu hydratés solides ou pâteux.

Température optimale d'action

Sur la figure 7 sont représentées les courbes d'activité à pH 7 de la lipoxygénase pure et non purifiée en fonction de la température. On constate que l'optimum d'action se situe autour de 25°C dans les deux cas, mais que la thermosensibilité de l'enzyme pure est plus grande que celle de l'extrait brut, ce qui est vraisemblablement dû à la présence dans cet extrait de substances protectrices vis-à-vis de la dénaturation thermique de la protéine enzymatique.

Bien que la technique opératoire employée soit imprécise, nous avons mis nettement en évidence une activité lipoxygénasique à des températures inférieures à 0°C dans un milieu réactionnel congelé.

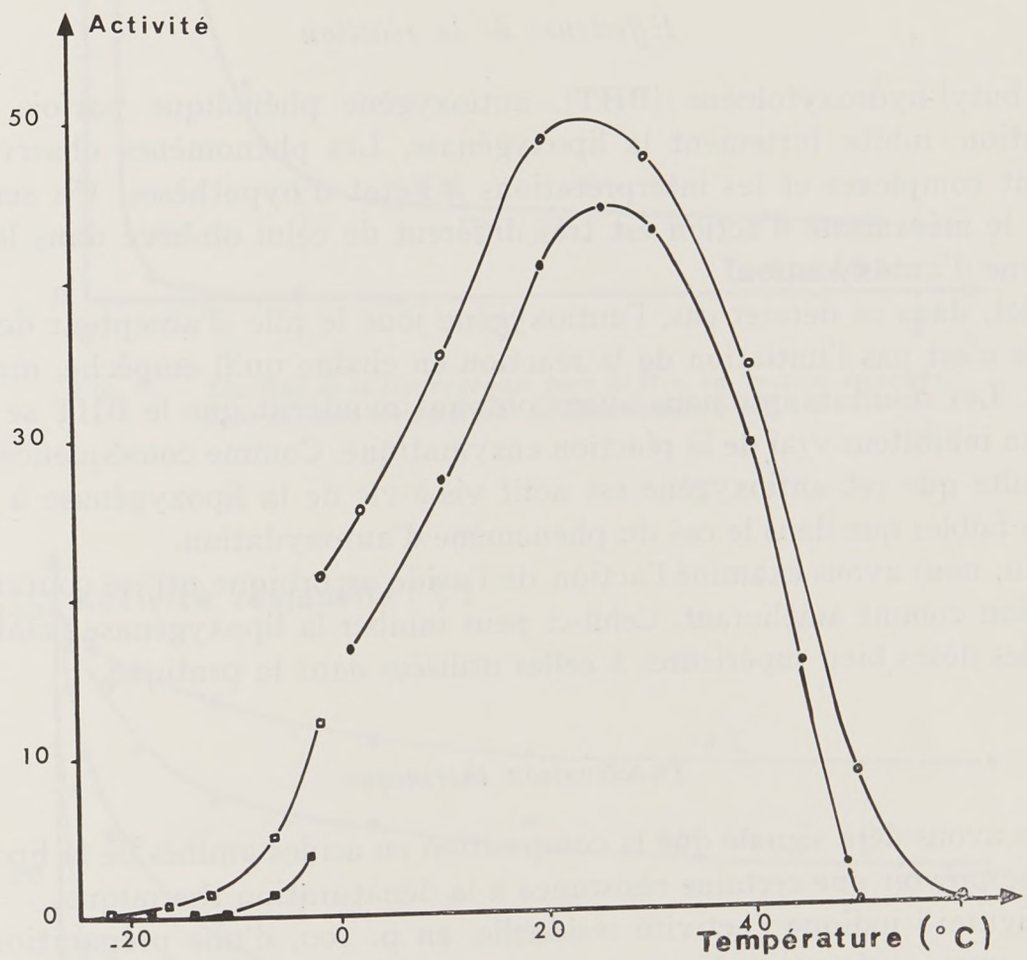


Fig. 7. — *Évolution de l'activité lipoxygénasique en fonction de la température. Au-dessous de — 2°C, le milieu réactionnel est solide*

●———■ lipoxygénase pure
○———□ extrait brut de farine de fève

La discontinuité des courbes que l'on observe vers 0°C résulte vraisemblablement d'une variation de l'énergie d'activation de la réaction. Nous avons calculé que de 7 kcal/mole au-dessus de 0°C, l'énergie d'activation atteint 23 kcal/mole au-dessous de 0°C. Cette différence peut correspondre au fait que la diminution de température

entraîne des modifications au niveau de la participation de l'eau à la structure de la macromolécule protéique, structure responsable de l'abaissement de la barrière d'énergie de la réaction. Quoiqu'il en soit, l'importance technologique de ce phénomène doit être soulignée, car cela revient à dire que le stockage à basse température n'empêche pas les effets néfastes de la lipoxygénase, observation qui est particulièrement importante en technologie des légumineuses et tout spécialement en ce qui concerne le pois.

pH optimal d'action

Les courbes montrant l'évolution de l'activité lipoxygénasique en fonction du pH du milieu réactionnel présentent à 25°C un optimum net aux environs de pH 6,8.

Cependant, on doit noter la très nette sensibilité de la lipoxygénase aux pH basiques. Les pH d'inactivation sont situés au voisinage de 5 et de 9.

Effecteurs de la réaction

Le butyl-hydroxytoluène (BHT), antioxygène phénolique parfois utilisé en alimentation, inhibe fortement la lipoxygénase. Les phénomènes observés restent cependant complexes et les interprétations à l'état d'hypothèses. Un seul fait est certain : le mécanisme d'action est très différent de celui observé dans le cas d'un phénomène d'autoxydation.

En effet, dans ce dernier cas, l'antioxygène joue le rôle d'accepteur de radicaux libres ; ce n'est pas l'initiation de la réaction en chaîne qu'il empêche, mais sa propagation. Les résultats que nous avons obtenus montrent que le BHT se comporte comme un inhibiteur vrai de la réaction enzymatique. Comme conséquence pratique, il en résulte que cet antioxygène est actif vis-à-vis de la lipoxygénase à des doses bien plus faibles que dans le cas du phénomène d'autoxydation.

Enfin, nous avons examiné l'action de l'acide ascorbique utilisé couramment en panification comme améliorant. Celui-ci peut inhiber la lipoxygénase, malheureusement à des doses bien supérieures à celles utilisées dans la pratique.

Inactivation thermique

Nous avons déjà signalé que la composition en acides aminés de la lipoxygénase pure laisse prévoir une certaine résistance à la dénaturation thermique.

La figure 8 indique l'activité résiduelle, en p. 100, d'une préparation de lipoxygénase pure, en fonction du temps, pour diverses températures à pH 5,5. A 70°C, il faut dépasser 30 mn de traitement pour faire disparaître la totalité de l'activité. A 60°C, on ne peut espérer faire disparaître plus de 50 p. 100 de l'activité, même pour des temps de chauffage longs.

La thermorésistance de l'enzyme se trouve encore accrue si elle se trouve dans son milieu naturel peu hydraté, tel que celui représenté par la farine de fève. Un traitement thermique de 10 mn à 105°C ou de 1 heure à 100°C est nécessaire dans le cas où l'on désire obtenir une farine de fève d'activité lipoxygénasique nulle (fig. 9).

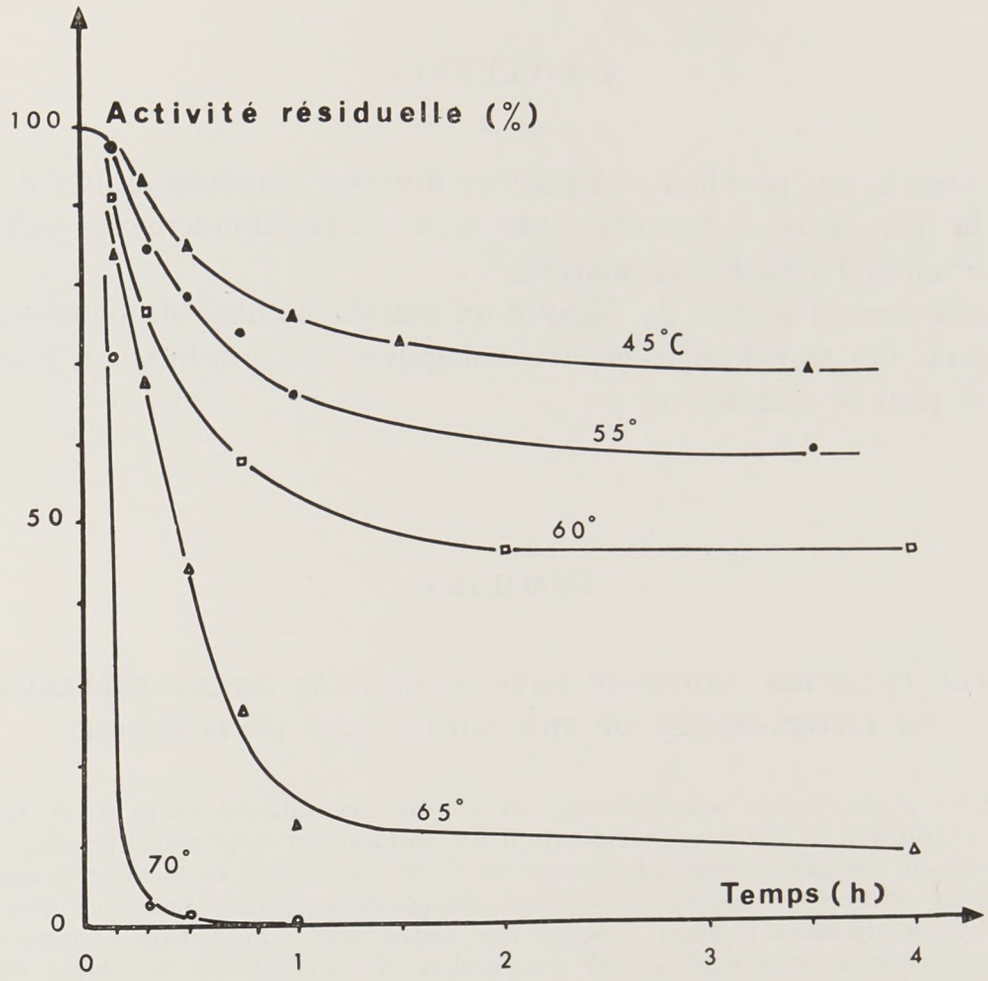


FIG. 8. — *Stabilité de la lipoxygénase pure de fève, en fonction du temps, pour diverses températures de conservation à pH 5,5*

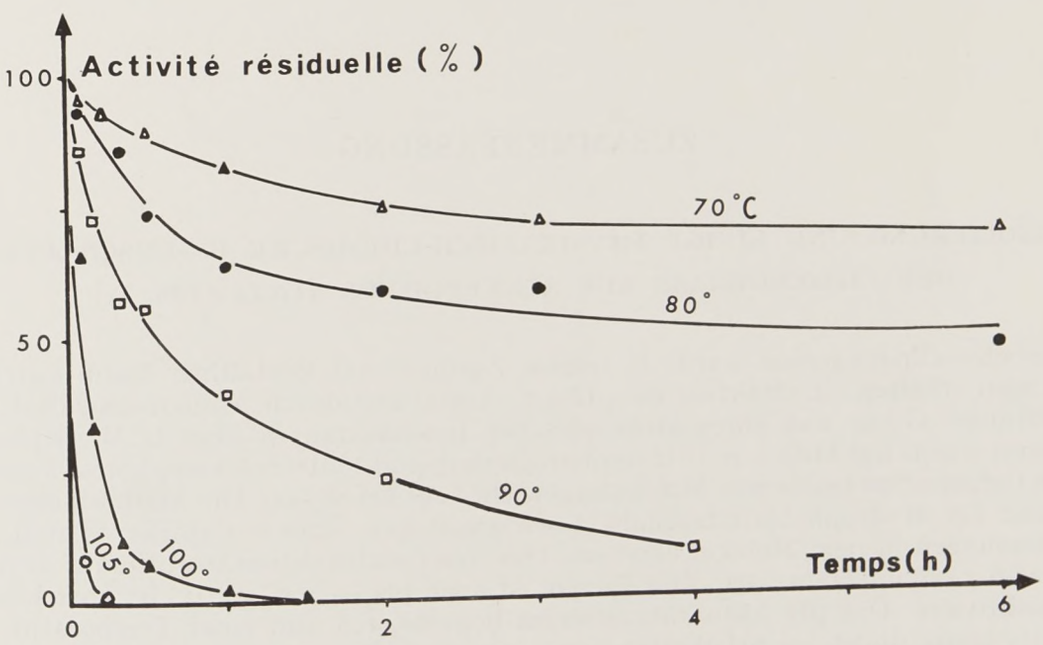


FIG. 9. — *Inactivation thermique de la lipoxygénase présente dans la farine de fève, en fonction de la durée du traitement, pour diverses températures*

CONCLUSION

Ainsi, nous avons pu aboutir à préciser diverses caractéristiques de la lipoxygénase de la fève, isolée à la suite d'une série de fractionnements permettant de respecter au mieux l'activité enzymatique.

Ce travail nous a permis de dégager un certain nombre de conséquences pratiques vis-à-vis des transformations technologiques des produits où l'action de la lipoxygénase peut se manifester.

SUMMARY

THE ISOLATION AND SOME PHYSICOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF LIPOXYGENASE OF THE HORSE BEAN (*VICIA FABA L*)

Horse bean lipoxygenase was obtained in a pure crystallized state after the following treatments : extraction at pH 4.5, precipitation by ammonium sulphate, filtration on dextran gel G-200 and ion exchange chromatography on C. M. Sephadex C-50. The preparation was homogeneous by ultracentrifugation and « disc-electrophoresis » techniques. Its molecular weight, determined by gel filtration, is about 88 000. The amino acid composition and average hydrophobicity suggest the existence of a high proportion of hydrophobic bonds in the molecule. The optimum pH is 6.8 for a temperature of 25°C, the pHs of inactivation being approximately 5 and 9. The optimum temperature at pH 7 is nearly 25°C. Still active at — 20°C, it is totally inactivated at about 50°C. BHT is an inhibitor of the enzymatic activity, but does not act as a classical antioxygant. Heat treatment on horse bean flour during 10 mn at 105°C or 1 hour at 100°C completely inactivates lipoxygenase.

ZUSAMMENFASSUNG

ISOLIERUNG UND EINIGE PHYSIKALISCH-CHEMISCHE EIGENSCHAFTEN DER LIPOXYGENASE AUS ACKERBOHNEN (*VICIA FABA* L.)

Ackerbohnenlipoxygenase wurde in reinem Zustand und kristalliner Form durch folgende Behandlungen erhalten : Extraktion bei pH 4,5, Ausfällung durch Ammoniumsulfat, Filtration über Dextrangel G-200 und chromatographischer Ionenaustausch über C. M. Sephadex C-50. Das Präparat wurde mit Hilfe von Ultrazentrifugierung und Plattenelektrophorese homogenisiert. Das durch Gelfiltration bestimmte Molekulargewicht liegt bei 88 000. Die Aminosäurenzusammensetzung und der Hydrophobizitätsgehalt lassen annehmen, dass ein starker Anteil an hydrophoben Bindungen in dem Molekul existiert. Das Temperaturaktivitätsoptimum liegt für einen pH Wert von 7 bei ungefähr 25°C. Das Enzym ist noch bei — 20°C aktiv, ist aber bei 50°C vollständig inaktiviert. Das pH-Aktivitätsoptimum liegt bei 6,8 und einer Temperatur von 25°C, eine Inaktivierung findet bei pH-Werten von 5 und 9 statt.

BHT verhält sich nicht wie ein typischer Antioxydant sondern wie ein wirklicher Inhibitor der enzymatischen Reaktion. Die Lipoxygenase von Ackerbohnenmehl wird durch eine Hitzebehandlung von 10 Min. bei 105°C oder von 1 Stunde bei 100°C vollständig inaktiviert.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André E., Hou K., 1932. Sur la présence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja. *C. R. Acad. Sci.*, **194**, 645-647.

Bloemendal H., 1963. Zone electrophoresis in blocks and columns. *Chem. Weekblad*, **59**, 281.

Guss P. L., Ridcharson T., Stahmann M., 1968. Oxidation of various lipid substrates with unfractionated soybean and wheat lipoxidase. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **45**, 272-276.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

Surrey K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

Tappel A. L., 1961. Lipoxidase and hematin compounds. In *Autoxidation and antioxidants*, **1**, 325-364. Interscience Publishers.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 323-334.

ACTIVITÉS LIPASIQUE ET LIPOXYGÉNASIQUE DES BLÉS ET PRODUITS DE MOUTURE

A. COLAS et A. CHARGELEGUE

Laboratoire A. R. I. A.,
65, quai de la Gare,
75013 Paris

RÉSUMÉ

Il est difficile de dissocier l'activité lipoxygénasique de l'activité lipasique puisque c'est la lipase qui fournit les substrats à la lipoxygénase. Les travaux effectués avaient pour but de déterminer l'activité lipoxygénasique des blés selon leur variété, leur lieu de culture, leur état de maturation, de suivre l'évolution de cette activité au cours du stockage, enfin d'en étudier la répartition en mouture sur cylindres et en classification par air.

INTRODUCTION

La lipase et la lipoxygénase sont deux enzymes qui dégradent certains constituants des matières grasses. La lipase est le facteur responsable, en majeure partie, de l'acidification des grains et des farines. Quant à la lipoxygénase, son activité est liée à celle de la lipase, car c'est cette dernière qui fournit les substrats à la lipoxygénase. Elle est en partie responsable du rancissement et préjudiciable aux caractéristiques organoleptiques du pain puisque les produits qu'elle contribue à former provoquent une altération de l'odeur et de la saveur.

Nous allons aborder successivement l'examen de ces deux enzymes en nous limitant aux aspects suivants : méthode de dosage de leur activité dans les produits céréaliers, résultats obtenus sur les blés et produits de mouture.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 68-01-213-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

I. — ACTIVITÉ LIPASIQUE

Les lipases sont largement répandues dans toutes les espèces animales, végétales ou microbiennes. Pour nous limiter aux végétaux, elles ont été signalées dans de nombreuses espèces, en particulier le ricin, le soja, le colza, le fruit de palme, l'avocat, l'orge, le blé, l'avoine et le riz.

En ce qui concerne le blé, SULLIVAN et HOWE (1933) ont, les premiers, mis en évidence une action lipolytique dans le germe de blé ; WIDHE (1961) a examiné l'évolution de l'activité lipolytique au cours de la maturation du grain ; celle-ci diminue et devient très faible à maturité. STAUFFER et CLASS (1966) ont isolé différentes estérases, mais la lipase n'a pas reçu d'attention particulière. DRAPRON *et al.* (1969) ont montré que l'activité lipolytique du blé, très faible dans le grain au repos, augmente considérablement au cours de la germination et se trouve localisée presqu'exclusivement dans la gemmule, en particulier dans le coléoptile.

1. — *Méthode utilisée*

La méthode de DRAPRON et SCLAFANI (1969) permet de déterminer de manière spécifique l'activité lipolytique de divers produits solides ou pâteux. Son principe est fondé sur le dosage, par chromatographie en phase gazeuse, de la quantité d'acides gras libérés dans un mélange peu hydraté de la substance à examiner et d'huile d'olive.

L'huile d'olive est incorporée au produit préalablement délipidé. Le mélange est placé à 30°C et à une humidité relative constante égale à 80 p. 100. Au bout d'un temps déterminé, les lipides sont extraits, les acides gras sont séparés globalement par chromatographie sur couche mince, puis successivement élués, estérifiés et dosés par chromatographie en phase gazeuse en présence d'un étalon interne. On obtient ainsi des résultats à 5 p. 100 près.

2. — *Résultats obtenus*

Il est admis que l'activité lipolytique des grains de céréales se manifeste faiblement dans l'amande amylacée et se trouve principalement localisée dans l'embryon et les parties périphériques du grain. Généralement, on ne constate pas de corrélation entre la teneur en lipides et l'activité lipasique. Les résultats reportés dans le tableau I confirment ces données.

TABLEAU I

Produit	Activité lipasique en mg d'acide oléique libéré par g de produit	Teneur en matière grasse (p. 100 MS)
Farine	1,0 à 1,5	1,5
Gros sons	7	2,2
Germe	4	8
Farine de Fève	2	1,7

On constate en particulier que la plus forte activité lipolytique se trouve non pas dans le germe mais dans le son (comme ROTHE le signale en 1960, alors que d'autres auteurs sont d'un avis contraire).

II. — ACTIVITÉ LIPOXYGÉNASIQUE DES BLÉS ET PRODUITS DE MOUTURE

1. — *Méthode utilisée*

Nous avons utilisé la méthode spectrophotométrique de dosage des diènes conjugués, décrite par SURREY en 1964. Pour mémoire, rappelons que le principe de cette méthode repose sur le fait que les hydroperoxydes, formés par action de la lipoxygénase, possèdent des doubles liaisons conjuguées *cis — trans* présentant un maximum d'absorption dans l'ultra violet.

Tous nos résultats sont exprimés en unités lipoxygénasiques, l'U.LPX étant définie comme l'activité enzymatique qui conduit en une minute à une densité optique de 100×10^{-2} pour une prise d'essai de 1 ml ; les chiffres sont rapportés à 1 g de produit tel quel.

Nous avons trouvé un inconvénient à cette technique spectrophotométrique : c'est la difficulté de la lecture des DO lorsqu'on obtient des extraits colorés ; c'est le cas des blés entiers broyés, des issues et des passages de mouture riches en enveloppes.

C'est la raison pour laquelle tous les résultats dont nous faisons état dans la suite de ce travail ont été obtenus sur des farines : farines industrielles ou farines d'essai obtenues au moulin de laboratoire Brabender senior.

La répétabilité de nos résultats est de ± 0,2 U.LPX par g, ce qui nous a amenés à considérer comme significatives des différences de 0,5 U.LPX.

2. — *Résultats obtenus*

Nous allons passer en revue successivement les blés de la récolte 1967, une variété cultivée en différentes régions, puis 33 variétés cultivées en un même lieu afin de dégager l'influence respective de ces deux facteurs. Nous verrons ensuite rapidement l'influence de l'état de maturité et de la germination sur l'activité lipoxygénasique avant d'étudier l'influence de la mouture et de la turboséparation et pour terminer nous dirons quelques mots de la variation dans le temps de l'activité lipoxygénasique.

a) *Blés de pays courants de la récolte 1967.*

Cinquante-cinq échantillons ont été analysés entre le 12 juin et le 25 juillet 1968. Ces échantillons proviennent de 21 départements allant du nord au sud-ouest de la France avec une représentation plus importante de la région parisienne.

21	échantillons	Seine-et-Marne ;
4	—	Loiret ;
3	—	Eure-et-Loir, Marne, Yonne ;
2	—	Aisne, Charente, Gers, Lot-et-Garonne, Yvelines ;
1	—	Essonne, Aube, Charente-Maritime, Vienne, Haute-Vienne, Landes, Ardennes, Nord, Oise, Pas-de-Calais, Somme.

Le faible nombre d'échantillons analysés pour certains départements ne permet pas de mettre en évidence des différences régionales. D'ailleurs, se superpose à cette

influence régionale le facteur variété qui est important comme nous le verrons par la suite. Nous nous contenterons donc d'examiner la répartition des valeurs trouvées (fig. 1).

On constate que l'éventail des valeurs est relativement restreint (0,45 à 2,5) et que 46 valeurs sur 55 (84 p. 100) se situent entre 1 et 2 U.LPX par gramme.

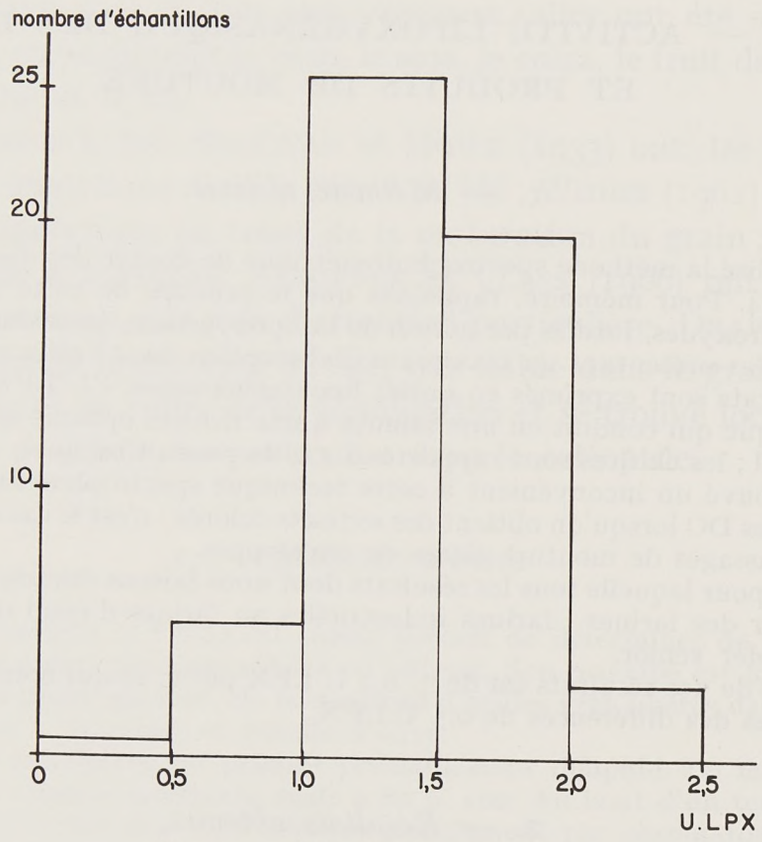


FIG. 1. — *Blés récoltés en 1967*

Les temps de chute Hagberg, qui s'étalent de 252 à 390, montrent que l'ensemble des échantillons examinés présentait une faible activité alpha-amylasique ; il est donc normal que nous n'ayons pas pu mettre en évidence de relation entre les temps de chute et les activités lipoxygénasiques.

De même les taux de cendres des farines (0,40 à 0,62) correspondent à des taux d'extraction de l'ordre de 65 p. 100 en mouture de laboratoire et l'on peut considérer ce facteur comme relativement constant.

En ce qui concerne les protéines, nous avons remarqué que l'activité lipoxygénasique avait tendance à augmenter en même temps que le taux de protéines. Les résultats cependant ne sont pas assez nets pour que nous en fassions état.

b) *Influence du lieu de culture.*

Le blé *Splendeur* cultivé en 26 lieux différents nous a été adressé par l'intermédiaire de l'I. T. C. F. (Institut technique des Céréales et Fourrages). La répartition des valeurs trouvées est donnée par la figure 2.

La moyenne des valeurs se situe aux environs de 2 U.LPX par gramme de farine, ce qui est un peu supérieur à la moyenne des blés de la récolte 1967.

La répartition géographique des valeurs ne permet de tirer aucune conclusion quant à l'influence de terroir sur l'activité lipoxygénasique des grains.

Nous n'avons pas non plus trouvé de relation entre l'activité U.LPX des farines et leur teneur en protéines ni avec leur activité alpha-amylasique (mesurée par le temps de chute Hagberg).

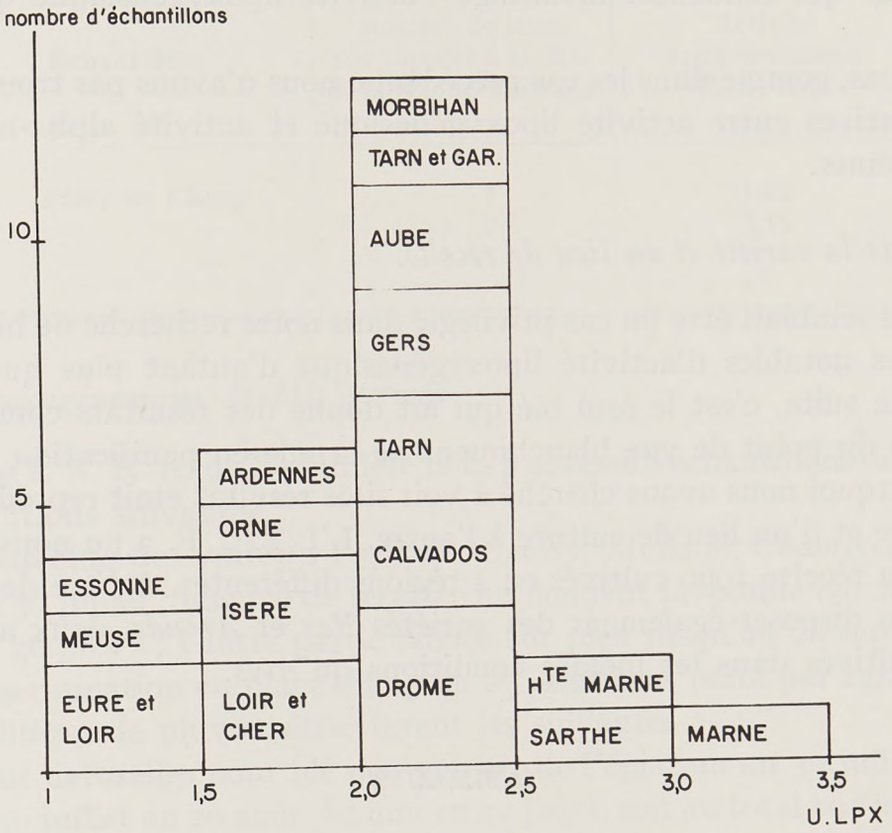


FIG. 2. — *Influence du lieu de culture* (Variété *Splendeur*)

c) *Influence de la variété.*

Trente-trois variétés cultivées dans la ferme de l'I. T. C. F. à Boigneville (Essonne) ont été examinées et les résultats sont rassemblés dans la figure 3.

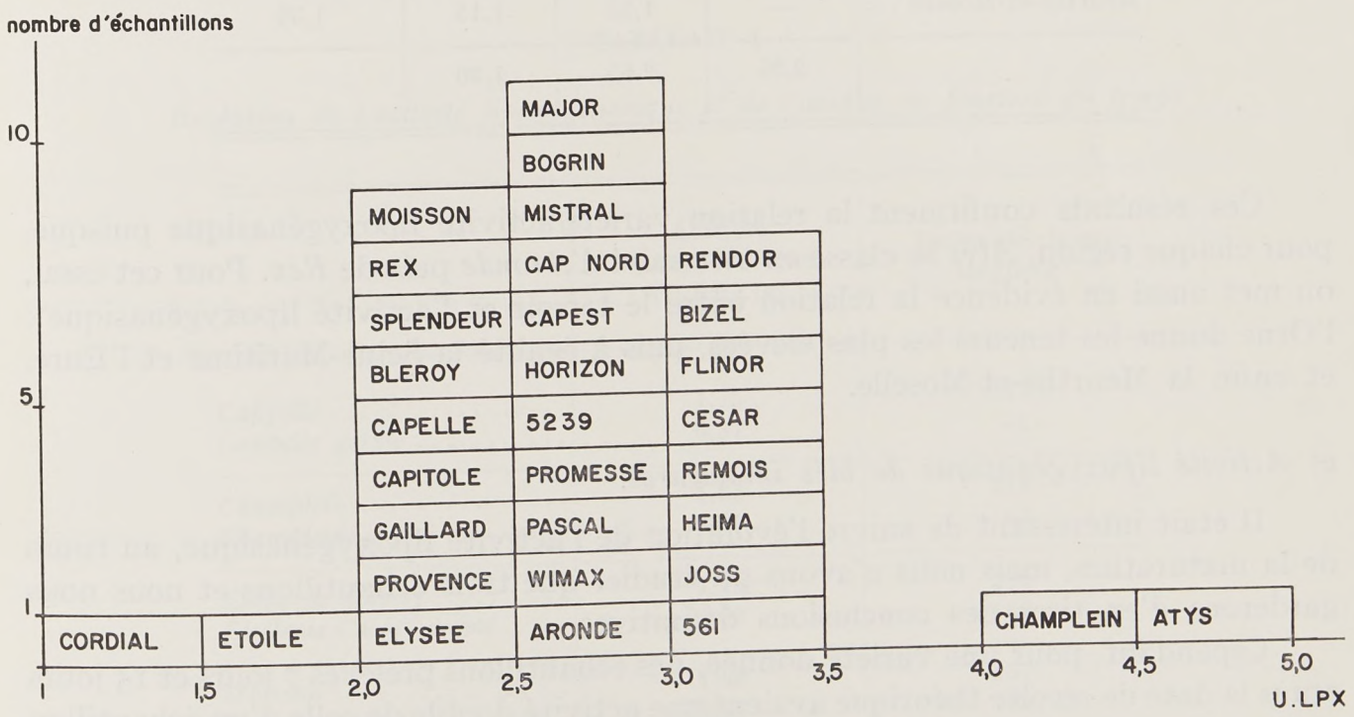


FIG. 3. — *Influence de la variété*

La moyenne se situe à 2,75, c'est-à-dire à un niveau plus élevé que pour le blé *Splendeur* cultivé en 26 lieux différents et que pour les blés de la récolte 1967 examinés.

L'éventail des valeurs est plus large (1,15 à 4,65) ce qui suggère que la variété est un facteur qui influence davantage l'activité lipoxygénasique que le lieu de récolte.

Dans ce cas, comme dans les cas précédents, nous n'avons pas trouvé de corrélations significatives entre activité lipoxygénasique et activité alpha-amylasique ou taux de protéines.

d) *Influence de la variété et du lieu de récolte.*

Atys nous semblait être un cas privilégié dans notre recherche de blés présentant des différences notables d'activité lipoxygénasique d'autant plus que, comme on le verra par la suite, c'est le seul blé qui ait donné des résultats comparables à la farine de fève du point de vue blanchiment de la mie en panification.

C'est pourquoi nous avons cherché à voir si ce résultat était reproductible d'une année à l'autre et d'un lieu de culture à l'autre. L'I. T. C. F. a pu nous procurer des blés *Atys* de la récolte 1969 cultivés en 4 régions différentes. A titre de comparaison nous avons pu disposer également des variétés *Rex* et *Aronde*, deux autres blés de printemps, cultivés dans les mêmes conditions qu'*Atys*.

TABLEAU 2

Récolte 69	*Aronde*	*Atys*	*Rex*	Moyenne
Orne	3,05	3,50	1,45	2,65
Seine-Maritime	2,00	2,85	1,25	2,0
Aisne.....	2,00	2,75	1,25	2,0
Meurthe-et-Moselle ...	—	1,55	1,15	1,35
	2,35	2,65	1,30	

Ces résultats confirment la relation variété/activité lipoxygénasique puisque, pour chaque région, *Atys* se classe en tête suivi d'*Aronde* puis de *Rex*. Pour cet essai, on met aussi en évidence la relation entre le terroir et l'activité lipoxygénasique : l'Orne donne les teneurs les plus élevées, puis à égalité la Seine-Maritime et l'Eure, et enfin la Meurthe-et-Moselle.

e) *Activité lipoxygénasique de blés immatures.*

Il était intéressant de suivre l'évolution de l'activité lipoxygénasique, au cours de la maturation, mais nous n'avons pu étudier que trois échantillons et nous nous garderons d'en tirer des conclusions définitives.

Cependant, pour une variété donnée, des échantillons prélevés 7 jours et 15 jours après la date de récolte théorique avaient une activité double de celle d'un échantillon prélevé 7 jours avant cette même date.

TABLEAU 3

Échantillons	Nombre de jours par rapport à la date de la récolte théorique	Activité lipoxygénasique (U.LPX/g)
Étoile de Choisy	— 7	1,05
— —	+ 7	2,15
— —	+ 15	2,10

f) *Activité lipoxygénasique de blés germés.*

La station I. N. R. A. de La Minière nous a adressé 8 échantillons de blés préparés dans les conditions suivantes :

Quatre parcelles des variétés *Cappelle, Choisy, Moisson, Champlein* avaient été subdivisées le 30 juillet ; une partie récoltée au moment favorable (20 août) constitue les lots « non germés » ; l'autre partie laissée sur pied jusqu'au 20 septembre a subi un début de germination en place du 25 au 29 août sans perte par égrenage.

Les conditions de pluviométrie furent les suivantes :

Conditions naturelles pour blé non germé : de l'épiaison au 30 juillet, 112 mm en 24 jours ; du 30 juillet au 20 août, 82 mm en 12 jours, soit au total 194 mm en 36 jours pluvieux.

Conditions d'humidification prolongée sur pied (lot germés) : du 20 août au 20 septembre, 78 mm par les pluies (en 13 jours pluvieux) et 65 mm d'apports par aspersion (soit 12 mm le 31-7, 8 mm le 6-9, 25 mm le 9-9, 20 mm le 12-9) soit au total 143 mm d'excédent de pluviométrie en 17 jours d'humidification.

TABLEAU 4

Évolution de l'activité lipoxygénasique et de l'acidité en fonction du temps

Essais	Activité lipoxygénasique (U.LPX/g)	Temps de chute Hagberg
Cappelle	1,75	227
Cappelle germé	0,57	61
Champlein	1,85	215
Champlein germé	0,67	63
Étoile de Choisy	1,75	290
Étoile de Choisy germé	1,00	87
Moisson	1,50	257
Moisson germé	0,95	194

Cette différence de traitement est bien traduite par les temps de chute Hagberg (tabl. 4) : les blés germés ont une activité alpha-amylasique très nettement supérieure aux blés récoltés dans des conditions normales.

En ce qui concerne l'activité lipoxygénasique de ces échantillons, on constate qu'elle est nettement plus basse dans les blés germés que dans les blés sains. Cette diminution rapide de l'activité lipoxygénasique au cours de la germination avait été signalée par DRAPRON et UZZAN en 1968.

g) *Influence de la mouture.*

L'étude a porté sur une farine première de blés de pays et sur 7 passages caractéristiques :

— 4 de l'amande centrale : B_2-Cl_1-Cl_1-C_2 ;
— 2 de l'amande périphérique : S_{IV}-C_7 ;
— 1 riche en produits germeux : Cl_3.

Les résultats reportés dans le tableau 5 montrent des activités lipoxygénasiques très différenciées.

TABLEAU 5

Passage	Cendres	U.LPX
C_1	0,33	1,30
Cl_1	0,365	1,45
Cl_2	0,365	1,20
B_2	0,495	2,30
Farine	0,50	2,85
Cl_3	0,625	4,70

Les farines d'amande centrale (Cl_1-Cl_2-C_1) à taux de cendres faible (0,33 à 0,365) présentent les activités les plus faibles (1,2 à 1,45).

Ensuite, on trouve la farine B_2 qui vient également de l'amande centrale (mais a un taux de cendres de 0,495) et la farine entière.

Enfin, le passage riche en produits germeux.

Les passages S_{IV} et C_7 provenant de l'amande périphérique donnent des extraits enzymatiques trop colorés pour permettre une mesure au spectrophotomètre. Il faudrait pour ce type de produit utiliser une autre méthode de dosage.

h) *Activité lipoxygénasique des farines turboséparées.*

On a déterminé l'activité lipoxygénasique de cinq séries de produits turboséparés (tabl. 6), chaque série comprenant :

— farine alimentation ;
— fraction grosse à teneur en protéines normale ;
— fraction moyenne à faible teneur en protéines ;
— fraction fine à forte teneur en protéines.

TABLEAU 6

Activité lipoxygénasique de farines turboséparées

Date	Composition en blé	Farine	p. 100	H_2O p. 100	N × 5,7 p. 100 MS	U.LPX par g SH
3-5-68	100 p. 100 blé français Récolte 67	Farine alimentation	100	15,5	10,2	2,5
		Fraction grosse	51,2	14,3	10,9	4,35
		Fraction moyenne	37,6	12,9	6,7	2,4
		Fraction fine	11,2	9,4	18,0	2,75
13-6-68	100 p. 100 blé français Récolte 67	Farine alimentation	100	15,4	10,3	1,4
		Fraction grosse	50,8	14,0	11,0	2,1
		Fraction moyenne	38	12,6	7,0	1,25
		Fraction fine	11,2	9,2	17,1	1,2
19-9-68	Blé français 40 p. 100 récolte 67 60 p. 100 récolte 68	Farine alimentation	100	15,0	10,2	2,00
		Fraction grosse	50,3	13,8	11,0	2,45
		Fraction moyenne	38,4	12,75	7,0	1,3
		Fraction fine	11,3	9,5	17,6	1,4
6-9-68	Blé russe 5 818	Farine alimentation	100	12,5	15,4	3,0
		Fraction grosse	30,6	13,0	16,5	1,7
		Fraction moyenne	57,1	12,8	11,7	2,9
		Fraction fine	12,3	11,7	28,4	7,0
6-8-68	Blé russe 5 818	Farine alimentation	100	12,5	15,4	3,0
		Fraction grosse	27,7	12,4	16,15	1,8
		Fraction moyenne	56	12,4	11,5	3,1
		Fraction fine	16,3	11,4	25,8	6,9

Les trois premières séries sont relatives à des farines de blé de pays français ; on constate que l'activité lipoxygénasique se concentre dans la fraction grosse, les fractions moyenne et fine ayant une activité inférieure à celle de la farine origine.

Dans les deux dernières séries relatives à des farines de blé russe, on remarque au contraire que l'activité lipoxygénasique se concentre dans la fraction fine et diminue dans la fraction grosse.

i) *Évolution de l'activité lipoxygénasique en fonction du temps.*

Cas des blés.

Notre expérience est limitée à l'examen de l'évolution de l'activité lipoxygénasique de 12 variétés différentes sur une durée de 2 mois seulement.

Nous avons constaté que 3 résultats n'ont pas varié, 12 ont diminué dans des proportions allant de 12 à 43 p. 100.

Cas des farines (tabl. 7 et fig. 4).

On constate avec le temps une diminution de l'activité lipoxygénasique d'autant plus sensible que la valeur initiale était plus élevée. Parallèlement, on remarque une augmentation de l'acidité libre, phénomène bien connu, accompagnant la maturation

TABLEAU 7. — *Évolution de l'activité lipoxygénasique et de l'acidité en fonction du temps*

Produit	Analyse	Temps 0	+ 30 jours	+ 60 jours
Farine première	U.LPX	2,85	1,60	1,20
	Acidité	0,021	0,035	0,045
B_2	U.LPX	2,30	1,25	0,80
	Acidité	0,021	0,039	0,056
Cl_1	U.LPX	1,45	1,05	0,75
	Acidité	0,019	0,024	0,029
Cl_2	U.LPX	1,20	1,15	0,85
	Acidité	0,020	0,025	0,029
C_1	U.LPX	1,30	1,10	0,85
	Acidité	0,019	0,027	0,029
Cl_3	U.LPX	4,7	2,55	2,2
	Acidité	0,026	0,037	0,047

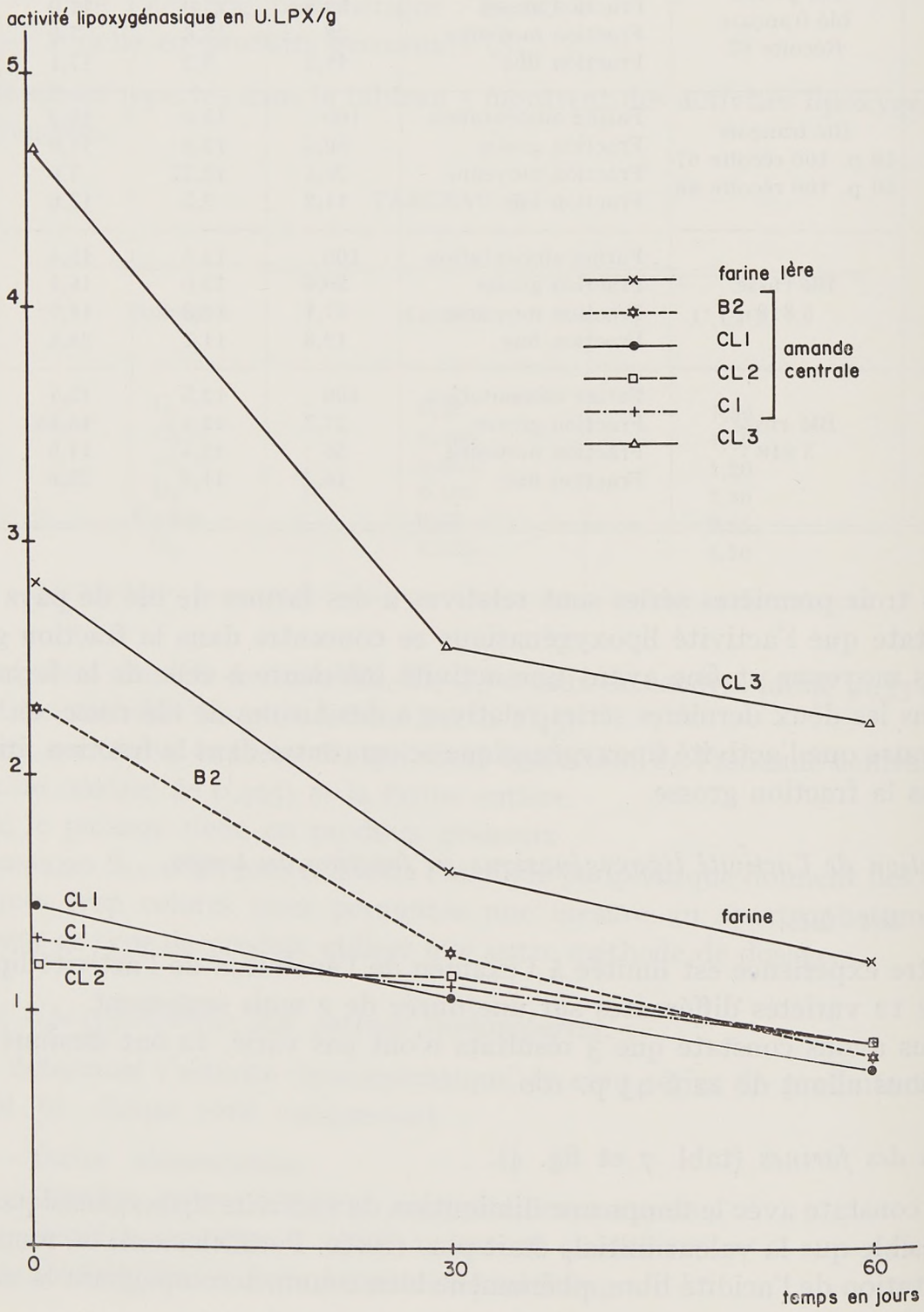


FIG. 4. — *Évolution de l'activité lipoxygénasique au cours du temps pour différents passages de mouture*

et le vieillissement des farines. Ces résultats viennent d'être confirmés par les travaux de Freimuth *et al.* (1972). Ces auteurs ont constaté que le stockage de la farine avait une influence néfaste sur l'activité lipoxygénasique, notamment lorsque la température de stockage était élevée : à 4°C, la chute d'activité était de 30 p. 100 en dix jours et, à 30°C, cette chute d'activité atteignait 70 p. 100.

III. — CONCLUSION

Les résultats présentés répondent à un certain nombre de questions que l'on se posait avant d'entreprendre cette action concertée.

L'activité lipoxygénasique de tous les blés examinés (analysés sous forme de farine) à varié de 0,45 à 4,65, c'est-à-dire dans un rapport de 1 à 10. Les écarts les plus importants ont été notés pour des blés de variétés pures cultivées dans un même lieu (*Cordial* 1,15 ; *Atys* 4,65) ce qui suggère que la variété exerce une influence non négligeable sur l'activité lipoxygénasique, mais d'autres facteurs ont aussi une action : lieu de culture (terroir et conditions climatiques), germination.

Au cours de la mouture, on constate que l'activité lipoxygénasique augmente avec la teneur en cendres des farines. La turboséparation déplace cette activité mais la nature du blé semble avoir une influence sur ce déplacement. Enfin l'activité lipoxygénasique des blés et des farines diminue au cours du stockage.

SUMMARY

LIPASIC AND LIPOXYGENASIC ACTIVITY OF WHEATS AND PRODUCTS OF MILLING

It is difficult to dissociate lipoxygenasic activity from lipasic activity since lipase supplies lipoxygenase with substrates. The aim of the work carried out was to determine the lipoxygenasic activity of the wheats according to the variety, place of growth and degree of maturation of the wheat, to observe the evolution of this activity during storage, and finally to study its distribution in cylinder milling and in air classification.

ZUSAMMENFASSUNG

LIPASE- UND LIPOXYGENASEAKTIVITÄTEN VON WEIZEN UND MAHLPRODUKTEN

Es ist schwierig, die Lipoxygenaseaktivität von der Lipase aktivität zu trennen, da die Lipase die Substrate für die Lipoxygenase liefert. Die durchgeführten Arbeiten beabsichtigten die Lipoxygenaseaktivität der Weizen in bezug auf Varietät, Abaugebiet— und Reifezustand zu bestimmen den Verlauf dieser Aktivität während der Lagerung zu verfolgen und schliesslich ihre Verteilung an Walzenmehlen und windgesichteten Mehlen zu beobachten.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Drapon R., Uzzan A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nutr. Alim.*, **22**, B 393-B 436.

Drapon R., Sclafani L., 1969. Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. *Ann. Technol. agric.*, **18** (1), 5-16.

Drapron R., Nguyen Xuan Anh, Launay B., Guilbot A., 1969. Evolution and distribution of wheat lipase activity in the course of germination. *Cereal Chem.*, **46**, 647-655.

Freimuth U., Ludwig E., Heinig R., Gebhardt E., 1972. Comportement de la lipoxygénase et de la peroxydase dans les farines et les pâtes de froment. *Die Nahrung*, **16** (3), 149-156.

Rothe M., 1960. Sur la présence de diverses estérases dans les graines végétales. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, **62** (11), 1031-1034.

Stauffer C. E., Glass R. L., 1966. The glycerol ester hydrolases of wheat germ. *Cereal Chem.*, **43**, 644-657.

Sullivan B., Howe M. A., 1933. Lipases of wheat. *J. amer. chem. Soc.*, **55**, 320-324.

Surrey K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxydase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 335-351.

RÉPERCUSSIONS DE L'ACTION DE LA LIPOXYGÉNASE DE LA FÈVE SUR LES CARACTÉRISTIQUES DES PÂTES ET DU PAIN

J.-J. ÉTIENNE (1) et M. DUBOIS (2)
avec la collaboration technique de R. Hémard et R. Odent

Laboratoire des Grands Moulins de Bobigny (3),
51, rue de Paris,
93000 Bobigny

RÉSUMÉ

En mettant en œuvre des essais de panification convenablement standardisés, nous montrons que le blanchiment excessif des pâtes et la flaveur désagréable des pains obtenus par la méthode dite « à pétrissage intensifié » peuvent être dûs à l'action de la lipoxygénase des farines de fèves introduites à un faible taux ($\leqslant$ 1,5 p. 100) dans les farines de blé.

Il est possible de remédier efficacement à ces altérations en utilisant des farines de fèves soumises au préalable à un traitement thermique approprié qui, sans altérer les propriétés améliorantes, obtention de pâtes plus faciles à travailler, de pains mieux développés, atténue ou supprime l'activité lipoxygénasique. Ainsi les pâtes obtenues blanchissent moins et les pains présentent une mie crème et sapide proche de celle du pain obtenu au pétrissage classique malgré l'usage du pétrissage intensifié.

Dans la perspective d'une application industrielle du traitement thermique des farines de fèves, nous avons mis au point un test colorimétrique (action d'un extrait aqueux de farines de fèves sur une émulsion de linoléate de sodium en présence de carmin d'indigo) qui permet d'apprécier rapidement le degré d'activité lipoxygénasique d'une farine de fèves donnée.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, la technique dite de « pétrissage rapide » ou « pétrissage intensifié » s'est répandue et généralisée dans presque tous les fournils. Elle a pour

(1) Adresse actuelle : Jean d'Albret-Orlane, Centre de Recherches, 166-168, avenue Georges-Clemenceau, 92000 Nanterre.
(2) Adresse actuelle : Établissements Chopin, 5, rue Escudier, 92100 Boulogne Billancourt.
(3) Adresse actuelle : Comptoir Commercial André, 4 *bis*, rue du Bouloi, 75041 Paris.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G .R. S. T. (contrat n° 68-01-228-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

avantage de donner des pâtes plus faciles à travailler et, dans un temps plus court, des pains mieux développés. En revanche, la mie obtenue est sensiblement plus blanche et a perdu une grande partie de sa saveur caractéristique (C. N. E. R. N. A., 1962 ; Drapron et Beaux, 1969).

En présence de farine de fèves, dont l'addition est permise jusqu'au taux maximal de 1,5 p. 100, ces phénomènes se trouvent amplifiés. Ainsi, en contrepartie des avantages généralement obtenus (pâtes plus faciles à travailler, pains mieux développés) on est en butte à des inconvénients sérieux : mie exagérément blanche et saveur désagréable ; on comprend alors que l'emploi des farines de fèves comme améliorant se soit trouvé remis en question.

En fait, on se borne le plus souvent à émettre l'hypothèse que ce blanchiment est dû à l'effet d'une lipoxygénase, des effets blanchissants comparables ayant pu être attribués à la présence de ce type d'enzyme dans les farines de blé ou dans certains adjuvants employés en panification, telle la farine de soja utilisée aux U. S. A. (C. N. E. R. N. A., 1962).

C'est pourquoi il nous a semblé opportun d'aborder méthodiquement l'étude des farines de fèves. Celles-ci n'ayant fait à notre connaissance l'objet que de fort peu de travaux, nous nous trouvions devant un champ d'investigation très vaste. Aussi nous sommes-nous proposés pour premiers objectifs :

1° de préciser, par une étude bibliographique, l'état actuel des connaissances relatives aux farines de fèves et aux graines, fèves et féveroles, dont elles proviennent et de compléter les renseignements recueillis, d'ordre botanique, chimique et biochimique par nos propres observations et nos analyses ;

2° de vérifier, par des essais de panification, convenablement standardisés, la relation présumée entre le blanchiment des pâtes et des mies et la présence de farine de fèves, ainsi que confronter les résultats obtenus avec ceux des mesures de l'activité lipoxygénasique des farines de fèves ajoutées ;

3° de rechercher les moyens, utilisables industriellement le cas échéant, d'atténuer, voire de supprimer totalement, les effets néfastes de blanchiment et d'altération de l'arôme attribuables aux dites farines ;

4° enfin, de mettre au point un essai technologique simple et rapide, par exemple un test colorimétrique de comparaison visuelle, permettant de s'affranchir du dosage de l'activité lipoxygénasique qui ne peut se faire qu'en laboratoire par une méthode longue et délicate et d'estimer ainsi, au moins qualitativement, l'activité blanchissante d'une farine de fèves inconnue.

ÉTUDE DU MATÉRIEL UTILISÉ, FÈVES ET FARINES DE FÈVES

I. — *Classification*

Les premiers essais de panification entrepris dans le cadre de cette étude ont fait apparaître des différences parfois très nettes dans les caractéristiques des pâtes et des pains en fonction des farines de fèves utilisées provenant de graines d'origine différente (Chine, Maroc, Angleterre, France...). Il était permis de penser que ces différences de comportement étaient liées, du moins pour une certaine part, à des différences variétales. Or, les connaissances sur les diverses variétés de l'espèce *Vicia faba* L. sont rares et leurs dénominations mêmes sujettes à confusion.

L'étude bibliographique des diverses caractéristiques de cette espèce nous a conduits aux observations suivantes (Reiser et Fraps, 1943 ; Sumner, 1943 ; Picard, 1953 ; Birdsong, Alston et Turner, 1960 ; Rowland et Corner, 1962 ; des Abbayes, Chadefaud et de Ferre, 1963 ; Balls, Axelrod et Kies, 1963 ; Bower, 1963; Fox, Thurman et Boulter, 1964 ; Crocker et Barton, 1966 ; Preusser, 1966 ; Gus, Richardson et Stahmann, 1967 ; Eden, 1968 ; Dubois et Étienne, 1970).

Les fèves sont grandes et aplaties ; les féveroles petites et rondes. Plusieurs classifications ont été proposées : elles reposent le plus souvent sur le poids de 100 grains (P_{100}) et se divisent en deux groupes : celles qui considèrent deux variétés : *Vicia faba major* et *Vicia faba minor* et celles qui considèrent trois variétés : *Vicia faba major, Vicia faba equina* et *Vicia faba minor.*

Il nous a semblé que la classification proposée par Picard (1953) était la mieux fondée. Elle comprend les variétés suivantes :

Vicia faba major	$P_{100} > 90$ g
Vicia faba equina.....	$65 \text{ g} < P_{100} < 90$ g
Vicia faba minor	$28 \text{ g} < P_{100} < 65$ g

En outre cette dernière variété est subdivisée en deux sous-variétés : *V. f. minor agrorum* ($P_{100} > 50$ g) et *V. f. minor minuta* ($P_{100} < 50$ g).

A la première variété correspond la dénomination habituelle de fève et aux deux suivantes celle de féverole (tabl. 1). Nous avons placé dans ce système les échantillons étudiés en provenance de Chine, Angleterre, Égypte, Maroc et Pologne.

TABLEAU I

Vicia faba L. : *classification*

Classification selon Picard (1953)	Variété	Échantillon	P_{100} (g)
Fève	*Vicia faba major*	GV/Maroc/A/14.118	100,4
		GV/Maroc/B/20.118	96,0
Féverole	*Vicia faba equina*	GV/Égypte/A/30.019	83,8
		GV/Chine/A/19.069	83,5
	Vicia faba minor	G/VO/Pologne/B/05.059	54,6
		G/VO/Angleterre/B/10.128	42,2

Il ne faut pas attribuer aux limites indiquées pour chaque espèce une valeur très fixe ; en effet, pour une variété donnée, des fluctuations du P_{100} peuvent apparaître, en fonction notamment des conditions culturales et climatiques.

Certains auteurs ont d'ailleurs eu conscience de l'imperfection de ce critère et suggéré qu'on retienne également des caractères morphologiques tels que la hauteur des plantes, la forme des gousses, la couleur des fleurs ou celles des graines. En fait, il ne semble pas y avoir à l'heure actuelle de résultats bien établis et satisfaisants dans ce sens.

L'analyse des protéines et des acides aminés (Picard, 1953 ; Rowlands et Corner, 1962 ; Fox, Thurman et Boulter, 1964 ; Preusser, 1966) ainsi que celle de certains pigments des feuilles, fleurs et graines (Fox *et al.*, 1964) font parfois apparaître des différences dans une variété considérée comme homogène. Aussi certains auteurs (Fox *et al.*, 1964) ont-ils suggéré l'utilisation de critères biochimiques à des fins taxonomiques. Mais ces travaux sont encore peu nombreux et aucun système ne semble près d'être établi sur cette base.

En outre, l'étude rapide de quelques travaux de génétique nous a montré que l'espèce *Vicia faba* L. était sujette à l'allogamie dans une proportion variable et souvent très importante (20 à 60 p. 100). En l'absence de précautions particulières, l'obtention de variétés bien définies est difficile et ceci pourrait expliquer, pour une certaine part, les difficultés et les imprécisions rencontrées dans la classification.

TABLEAU 2. — *Vicia faba* L. : *composition des graines*

	Field beans		*Horse bean* (Féverole)	*Field bean* (Fève)	*Bean* (haricot)	Soja	
	Throws MS (variété d'hiver, Fève)	*Minor* (variété de printemps, Féverole)					
Référence bibliographique	Eden (1968)	Eden (1968)	Crocker, Barton		Bower (1923)		Crocker, Barton
Eau (p. 100 SH)	—	—	12,5	11,8	13,49	12,71	9,8
Cellulose (p. 100 SS)	9,0 (7,5-10,6)	8,0 (6,0-10,6)	8,2	3,5	—	—	4,5
Protéines totales (p. 100 SS)	26,5 (24,3-29,9)	31,4 (25,5-35,4)	25,7	22,9	25,31	38,18	36,9
Protéines solubles (p. 100 SS)	24,0 (22,0-27,0)	28,2 (22,3-31,7)	—	—	—	—	—
Matières grasses (p. 100 SS) Extraction par l'éther	1,5 (1,3-1,7)	1,5 (1,2-2,0)	1,4	1,4	1,68	14,03	17,2
Matières minérales totales (p. 100 SS)	4,0 (3,4-4,4)	4,0 (3,1-4,8)	3,4	4,3	3,13	4,71	5,3
Matières siliceuses (p. 100 SS)	< 0,1 (0,0-0,1)	< 0,1 (0,0-0,2)	—	—	—	—	—
Ca (p. 100 SS)	1,22 (1,11-1,32)	1,17 (0,95-1,40)	—	—	—	—	—
Na (p. 100 SS)	0,02 (< 0,01-0,05)	< 0,01	—	—	—	—	—
Cl (p. 100 SS)	Traces	Traces	—	—	—	—	—
Mn p.p.m.	14 (9-19)	14 (8-20)	—	—	—	—	—

SH : substance humide ; SS : substance sèche.

2. — *Composition chimique des graines*

Dans le tableau 2, nous avons rassemblé les résultats les plus intéressants trouvés dans la littérature relatifs à la composition de quatre échantillons de graines de fèves et de féveroles : teneur en eau 11 p. 100 SH (substance humide), protéines brutes 25 à 30 p. 100 SS (substance sèche), matières grasses 1,5 p. 100 SS, cellulose 8 p. 100 SS. A titre de comparaison, nous avons aussi reporté les valeurs correspondantes pour le Haricot et le Soja. On remarque la teneur élevée en protéines « totales » de ces graines et la part importante de protéines « solubles » par rapport aux protéines « totales ». Eden (1968) signale que les variétés à gros grains semblent avoir des teneurs en protéines plus faibles (*Herz freya*, 29,8 p. 100 SS) que les variétés à petits grains (*Minor*, 34,6 p. 100 SS). Les variétés à maturation précoce paraissent également plus riches en protéines que les variétés tardives.

Parmi les études relatives aux enzymes de *Vicia faba* L., nous avons relevé notamment la présence d'une α-amylase ; aucune référence ne concerne l'existence d'une lipoxygénase.

3. — *Composition chimique des farines de fèves*

Nous avons regroupé, dans le tableau 3, les résultats des analyses de farines qui ont été effectuées au cours de cette étude. Les valeurs moyennes trouvées appellent les remarques suivantes :

Teneur en eau : voisine de 10 p. 100 (SS) pour les farines de fèves, plus élevée (13 p. 100) pour les farines de féveroles. Ceci peut être fonction de la variété, mais aussi du climat du pays où fèves et féveroles ont été cultivées.

Matières minérales : de l'ordre de 3,5 p. 100 (SS) pour les farines de fèves, elle est un peu plus élevée pour les farines de féveroles (4 p. 100).

Protéines totales : le taux des protéines totales est situé au voisinage de 35 p. 100 (SS). Cette teneur est légèrement plus élevée pour les farines de féveroles que pour les farines de fèves : on retrouve donc pour les farines les observations faites à propos des graines.

Protéines solubles : extraites à l'aide d'une solution de K_2SO_4 à 5 p. 100, elles représentent de l'ordre de 80 à 90 p. 100 des protéines totales ; cette propriété mériterait une étude particulière.

Matières grasses : elles ont été dosées après extraction par l'éther et par l'hexane à température d'ébullition du solvant. D'une façon générale, les farines de fèves sembleraient un peu moins riches (en moyenne 1,90-2,40 p. 100 SS) que les farines de féveroles (1,90-2,40 p. 100 SS).

Acides gras libres : l'analyse des acides gras libres (tabl. 4) a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse sur les extraits éther (Drapron et Sclafani, 1969). La teneur en acide linoléique libre est située entre 35 et 40 p. 100 des acides gras libres totaux pour les farines de fèves et un peu plus élevée (voisine de 45 p. 100) pour les farines de féveroles. La teneur en acide linoléique libre varie en raison inverse de l'activité lipoxygénasique.

Glucides : Les glucides solubles dans l'alcool à 80°G.L. ont été identifiés par chromatographie sur papier et dosés globalement par la méthode colorimétrique à l'anthrone. La quantité de glucides est un peu plus élevée dans les farines de fèves (8 p. 100 SS) que dans celle de féveroles (6 p. 100 SS). On ne dénote aucune différence particulière dans la composition des glucides présents, ni dans leurs quantités relatives : absence de glucose, fructose, maltose, mélibiose, prédominance très nette du saccharose, quantités faibles de raffinose.

Activité α-amylasique : examinée par addition de 1,5 p. 100 de farine de fèves à une farine de blé témoin, l'activité amylasique semble nulle dans les conditions où opère l'amylographe Brabender.

Activité lipoxygénasique : elle a été mesurée par la méthode de Surrey (1964). L'utilisation d'un échantillon « de référence » (farine conservée à — 20°C) a permis une comparaison acceptable des résultats obtenus à des dates différentes et dans des conditions expérimentales légèrement modifiées. L'activité des farines de fèves (200 U.LPX/g environ) est presque deux fois plus élevée que l'activité des farines de féveroles (100 U.PLX/g environ). Une unité lipoxygénase (U.LPX) correspond à la quantité de préparation enzymatique qui provoque une augmentation de 1 unité de densité optique à 234 nm à 25°C.

Des analyses ont été effectuées sur les farines de passage : elles ne mettent pas en évidenec de différences significatives.

TABLEAU 3

Composition des farines

Origine des farines de fèves (F/V) ou de féveroles (F/VO)	1 Humidité (p. 100 SH)	2 Matières minérales (p. 100 SS)	3 Protéines totales (p. 100 SS) (N × 6,25)	4 Protéines solubles (p. 100 SS) (N × 6,25)	5 Matières grasses éther (p. 100 SS)	6 Matières grasses hexane (p. 100 SS)	7 Glucides alcool 80°G.L (p. 100 SS)	8 Activité α-amyl. (UB)	9 Activité lipoxygén. (U.LPX/g)
F/V/Maroc/B/20.118	10,2	3,68	28,70	27,20 (94,7 %)	1,76	2,12	8,16	240	182
F/V/Chine/A/19.069	11,6	3,40	34,10	28,72 (84,3 %)	1,88	2,44	7,68	—	180
F/V/Maroc/A/14.118	9,2	3,68	32,40	27,00 (83,4 %)	1,90	2,22	8,28	250	174
F/V/Égypte/A/30.019	9,8	3,08	34,30	27,30 (79,6 %)	1,95	2,16	7,96	—	171
F/VO/Angleterre/B/10.128	13,7	3,99	35,00	31,10 (88,9 %)	2,01	2,39	6,80	245	103
F/VO/Pologne/B/05.059	12,4	3,83	34,50	28,70 (83,2 %)	1,88	2,42	6,48	—	98

1. Étuve à ventilation Brabender, 40 mn à 135°C.
2. Mode opératoire analogue à celui du dosage des matières minérales des farines de blé, 600 puis 900°C.
3. Méthode de Kjeldahl ; N × 6,25.
4. Protéines solubles dans une solution de K_2SO_4 5 p. 100 ; méthode de Kjeldahl, N × 6,25 ; les valeurs entre parenthèses représentent les pourcentages par rapport aux protéines totales.

5 et 6. Extraction au Kumagawa des matières grasses par l'éther ou l'hexane. Évaporation du solvant jusqu'à poids constant.

7. Glucides solubles dans l'éthanol à 80°GL dosés globalement par la méthode colorimétrique à l'anthrone.
8. Activité amylasique mesurée à l'aide de l'amylographe Brabender par addition de 1,5 p. 100 de la farine de fèves à tester à une farine de blé témoin ayant une viscosité de 245 UB.
9. Dosages par la méthode de SURREY (1964).

SH : substance humide ; SS : substance sèche.

TABLEAU 4

Acides gras libres des farines de fèves

Matières grasses totales extraites éther (p. 100 SS)		F/V/Égypte A/30.019	F/V/Maroc B/20.118	F/VO/Angl. B/10.128	F/VO/Pologne B/05.059
		$1,9_5$	$1,7_6$	$2,0_1$	$1,8_8$
Acides gras libres (p. 100 des acides gras libres totaux)	C_{16}	21,6	21,8	17,1	12,2
	$C_{16:1}$	0,9	2,0	0,8	0,4
	C_{18}	5,4	7,2	5,1	6,4
	$C_{18:1}$	27,0	32,9	27,6	33,5
	$C_{18:2}$	39,9	32,9	45,2	43,5
	$C_{18:3}$	5,2	3,2	4,2	3,7
	Total	100,0	100,0	100,0	99,7

L'ensemble de ces résultats analytiques, tant sur grains que sur farines, confirme les données botaniques et met en relief à plusieurs reprises (teneur en protéines, matières minérales, acides gras, glucides, activité lipoxygénasique...) une différence certaine et nette entre fève et féverole. Cette distinction apparaît donc bien fondée. D'après ce qui précède, il nous semblerait d'ailleurs préférable de situer la distinction fève/féverole non pas entre *V. f. major* et *V. f. equina*, mais plutôt entre *V. f. equina* et *V. f. minor*. (tabl. 5).

TABLEAU 5

Vicia faba L. *: activité lipoxygénasique des farines et classification des graines*

Échantillon	Activité lipoxygénasique des farines correspondantes U.LPX/g	Classification proposée
GV/Maroc/A/14.118	174	Fève
GV/Maroc/B/20.118	182	
GV/Égypte/A/30.019	171	
GV/Chine/A/19.069	180	
G/VO/Pologne/B/05.059	98	Féverole
G/VO/Angleterre/B/10.128	103	

RELATIONS ENTRE L'ACTIVITÉ LIPOXYGÉNASIQUE ET DIVERSES CARACTÉRISTIQUES DES PÂTES ET DU PAIN

1. — *Mise au point d'un essai standard de panification*

Le diagramme de panification que nous avons utilisé est présenté sur le tableau 6.

Un « jury » consigne avec soin les observations relatives au comportement des

pâtes, à la couleur des pâtes et des mies, à l'odeur et à la saveur de la mie, au volume et à l'aspect des pains. Ainsi chaque série d'essai, comprenant en général quatre ou cinq panifications, identifiées par un numéro de code et comportant toujours un témoin constitué par une farine de blé seule, donne lieu à des classements suivant la feuille de procès-verbal représentée sur le tableau 7.

TABLEAU 6

Essais de panification : diagramme

	Pétrin	Loiselet	Artofex	Mahot
Pétrissage	Quantité de farine (kg)	1,6		16
	Hydratation (%)	60-62, pâte bâtarde		
	Temps pétrissage et vitesse de rotation	17 mn-88 tr/mn	5 mn-44 tr/mn + 15 mn-62 tr/mn	5 mn-1re vit. + 15 mn-2e vit.
	Levure (g)	60		600
	Sel (g)	35-40		350-400
	Acide ascorbique	2 g au quintal		

Pointage (1re fermentation)	20 mn
Pèse et détente en boules	20 mn
Apprêt sur couche (2e fermentation).....	2 h

Dans un premier temps, les essais de panification sont réalisés en ajoutant 1,5 p. 100 de farine de fèves à étudier à une farine de blé exempte de farine de fèves. La comparaison des classements relatifs à la blancheur des pâtes et des mies avec les résultats des mesures de l'activité lipoxygénasique ne fait pas apparaître la corrélation espérée. En effet, les farines de fèves dont l'activité lipoxygénasique est la plus élevée ne conduisent pas, introduites dans la farine de blé, aux pâtes et aux mies les plus blanches. De plus, on remarque fréquemment que le classement des pâtes et celui des mies ne correspondent pas, les pâtes les plus blanches ne donnant pas, après cuisson, les mies les plus blanches.

Aussi ces constatations nous amenèrent-elles à nous demander si nous nous étions bien placés dans des conditions expérimentales convenables. C'est pourquoi nous avons examiné les différents paramètres susceptibles d'influer sur nos résultats et cherché à définir les modalités d'un essai standard de panification.

1. 1. *Influence de la teneur en farine de fèves.*

En ajoutant à une farine de blé des taux de 0,3 à 1,8 p. 100 de farine de fèves (activité 171 U.LPX/g), nous avons constaté que le blanchiment des pâtes en fin de pétrissage est peu perceptible jusqu'à 0,3-0,4 p. 100 de farine de fèves, net de 0,6 à 0,9 p. 100, mais pour des taux plus importants, 1,5 p. 100 par exemple, les blanchiments n'apparaissent plus fonction de la quantité ajoutée. Il y aurait donc un seuil (voisin de 0,5 p. 100) en-dessous duquel l'activité lipoxygénasique reste à peu près sans effet et une limite (voisine de 1 p. 100) au-delà de laquelle les blan-

TABLEAU 7

Procès verbal des essais de panification

Essais de panification du : .....

par MM. .....

Échantillons examinés :

A –
B –
C –
D –
E –
F –

TABLEAU DE CLASSEMENT DES RÉSULTATS

Critères	Classement							Remarques
	1	2	3	4	5	6		
1. Qualités plastiques au pétrissage : × formation de la pâte × fin de pétrissage								
2. Couleur des pâtes en fin de pétrissage								
3. Pointage								
4. Détente								
5. Façonnage								
6. Qualités plastiques des pâtes à l'apprêt								
7. Présentation du pain								
8. Développement								
9. Couleur de la mie + à — blanc								
10. Odeur de la mie + à — agréable								
11. Alvéolage mie								

Observations

chiments observés ne sont plus proportionnels et apparaissent même désordonnés.

Le taux initialement choisi, 1,5 p. 100, s'avérant donc trop élevé, nous avons décidé d'utiliser 0,9 p. 100 de farine de fèves dans nos essais.

1. 2. *Influence des conditions du pétrissage.*

La majeure partie de nos essais a été effectuée avec le pétrin Mahot afin de nous placer dans des conditions proches de celles du boulanger. A notre étonnement, le classement des pâtes ne correspondait presque jamais à celui des mies, la pâte la plus blanche conduisant rarement à la mie la plus blanche.

En revanche, au cours des essais effectués avec les pétrins Artofex et Loiselet, on observait une bonne correspondance entre les classements des pâtes et celui des mies.

On peut donc penser que la mauvaise concordance couleur des pâtes — couleur des mies, observée dans un grand nombre d'essais, provient des conditions du pétrissage. On conçoit en effet que les résultats soient plus irréguliers avec une masse importante de pâte brassée de façon inégale (Mahot) qu'avec une masse faible de pâte brassée efficacement (Artofex-Loiselet).

1. 3. *Influence de l'acide ascorbique.*

Le rôle des produits issus de l'action de la lipoxygénase sur l'acide ascorbique est mal connu. Il semblerait donc souhaitable d'éliminer cet améliorant de nos essais. Sa suppression entraîne une modification du diagramme de panification par augmentation du temps de pointage (1 heure au lieu de 20 minutes). Dans ces conditions, on constate que la couleur des pâtes, comme celle des mies après cuisson, évolue vers des nuances plus crème, ce qui rend plus difficile encore l'appréciation ultérieure des blanchiments relatifs.

D'ailleurs, bien que l'acide ascorbique ait un effet inhibiteur sur la lipoxygénase (Young et Giles, 1969), il apparaît qu'il faudrait des quantités d'acide ascorbique au moins cinq fois supérieures à celles utilisées pour devoir redouter un tel effet. L'utilisation d'acide ascorbique n'a donc pas pu perturber les résultats de nos essais.

1. 4. *Eau de « coulage ».*

Pour éviter la présence d'ions métalliques susceptibles d'avoir un effet sur l'activité de la lipoxygénase (Zn notamment), l'eau de ville utilisée pour le « coulage » est conservée en récipients de matière plastique.

1. 5. *Influence de la température des pâtes en fin de pétrissage.*

Une série d'essais a été réalisée aux pétrins Mahot et Artofex de façon à faire varier la température des pâtes en fin de pétrissage de 20 à 27°C en modifiant la température de l'eau de « coulage ». Toutes les autres conditions étant maintenues constantes par ailleurs (farines de blé et de fèves, hygrométrie...), des différences faibles dans la couleur des pâtes sont visibles et leurs corrélations avec la température sont difficiles à apprécier. Aussi, sans pouvoir nous engager dans l'étude de ces facteurs, nous sommes-nous efforcés par prudence d'obtenir des températures de pâtes aussi voisines que possible en fin de pétrissage.

1. 6. *Répétabilité des résultats des essais de panification.*

Pour nous assurer que les différences que nous prenions en considération, tant à propos de la couleur que des qualités des pâtes et des pains, ont une réelle signification, nous avons jugé indispensable d'examiner la répétabilité de ces essais. Dans ce but, nous avons introduit deux ou trois farines du même lot dans une série d'essais ou renouvelé à quelques jours d'intervalle la même série d'essais. D'une façon générale, les résultats sont assez satisfaisants, notamment en ce qui concerne les couleurs des pâtes et des mies. En revanche, l'appréciation des qualités plastiques des pâtes est une affaire plus subtile. Ceci justifie donc qu'on renouvelle au moins trois fois chaque série d'essais pour dégager, s'il y a lieu, une moyenne.

Même en respectant aussi scrupuleusement que possible les différents paramètres précédents, il ne faut pas perdre de vue que d'autres facteurs interviennent, hygrométrie, température... du fournil qui laissent toujours un caractère relatif aux observations concernant les qualités plastiques des pâtes par exemple. Ces essais de panification ne sauraient prétendre fournir des résultats aussi rigoureux qu'un dosage chimique.

2. — *Influence de l'origine des farines de fèves*

En travaillant avec les modalités que nous venons d'exposer, la correspondance entre les classements des mies en fonction de leur blancheur et les valeurs de l'activité lipoxygénasique devient tout à fait correcte.

Ainsi, à titre d'exemple, les essais 1610 et 1710 entrepris (tabl. 8) avec toutes les farines de fèves étudiées (pétrin Loiselet) montrent que le classement établi par ordre décroissant de la blancheur des pâtes et de celles des mies suit l'activité lipoxygénasique, les pâtes et les mies les plus blanches étant obtenues avec des farines de fèves présentant l'activité lipoxygénasique la plus élevée.

TABLEAU 8

Essais de panification : farines de fèves de diverses provenances

Séries d'essais de panification	Blancheur des pâtes fin pétrissage (ordre décroissant)	Activité lipoxygén. U.LPX/g	Blancheur des mies après cuisson (ordre décroissant)	Activité lipoxygén. U.LPX/g
essai 1610	F/V/Égypte/A/30.019	171	F/V/Égypte/A/30.019	171
	F/V/Chine/A/19.069	180	F/V/Chine/A/19.069	180
	F/V/Maroc/A/14.118	174	F/V/Maroc/A/14.118	174
	F/VO/Angleterre/B/10.128	103	F/VO/Angleterre/B/10.128	103
essai 1710	F/V/Maroc/B/20.118	182	F/V/Maroc/B/20.118	182
	F/V/Égypte/A/30.019	171	F/V/Maroc/A/14.118	174
	F/V/Maroc/A/14.118	174	F/V/Égypte/A/30.019	171
	F/VO/Pologne/B/05.059	98	F/VO/Pologne/B/05.059	98

3. — *Essais de panification à taux constant de lipoxygénase*

Ces essais ont été effectués pour vérifier les constatations précédentes. Le taux constant de lipoxygénase est obtenu par des additions en quantité variable (entre 0,8 et 1,5 p. 100) de farine de fèves d'activité lipoxygénasique connue. Deux séries d'essais ont été réalisées, l'une à 2,0 l'autre à 3,5 U.LPX/g de mélange farine de blé-farine de fèves. Dans les deux cas, la blancheur des pâtes en fin de pétrissage et celle des mies après cuisson ne présentent que peu ou pas de différence, tout classement étant d'ailleurs impossible. Il apparaît donc qu'à taux constant de lipoxygénase, on observe un blanchiment uniforme des pâtes et des mies.

Nous avons remarqué que, dans la première série d'essais (2,0 U.LPX/g de mélange), le classement des qualités des pâtes et des pains fait apparaître une nette supériorité de l'essai Angleterre dans lequel, par suite de sa faible teneur en lipoxygénase, la farine de fèves a été introduite au taux de 1,5 p. 100. Cette différence était-elle liée à la quantité de farine de fèves ajoutée ? En fait, au cours d'une seconde série d'essais, l'emploi du même taux de 1,5 p. 100 d'une farine de féveroles Pologne n'a montré aucune supériorité notable. Un facteur individuel pourrait donc apparaître ici.

Des essais plus nombreux, des analyses plus complètes, permettraient sans doute d'interpréter ces résultats. Il nous semble en tout cas que ces essais à taux constant de lipoxygénase pourraient constituer un moyen intéressant d'étude des qualités améliorantes des farines de fèves.

Ces deux types d'essais, taux constant de farine de fèves (teneur variable en lipoxygénase) et taux constant de lipoxygénase (teneur variable en farine de fèves) établissent qu'il existe un étroit parallélisme entre l'activité lipoxygénasique des farines de fèves et le blanchiment des pâtes et des mies. Ainsi se trouve vérifiée l'hypothèse, émise *a priori* au début de ces travaux, que la lipoxygénase est responsable des effets observés. Les essais de dégradation thermique que nous allons décrire maintenant confirment aussi cette conclusion.

TRAITEMENT THERMIQUE DES FARINES DE FÈVES

Pour remédier aux effets reprochés aux farines de fèves, on pourrait chercher à ne mettre en mouture que des variétés de faible activité lipoxygénasique ; c'est un moyen peu envisageable sur le plan pratique. Aussi un procédé permettant d'atténuer ou de supprimer l'activité lipoxygénasique a-t-il été recherché. Il semblait difficile, en fonction de l'hygiène alimentaire, d'envisager un procédé chimique. L'extraction de l'enzyme, soluble dans l'eau, n'est pas facilement réalisable industriellement. Il nous a paru que le moyen le plus aisé à mettre en œuvre serait un traitement thermique des fèves ou des farines extraites, ayant pour effet d'inactiver la lipoxygénase. Des essais ont été effectués dans ce sens sur des farines de fèves, à différentes températures pendant un même temps, à une même température pendant des durées variables.

Nous avons utilisé une étuve multicellulaire du type Chopin, nos échantillons étant disposés dans les nacelles classiques, en couche mince (1 mm) ou en couche

épaisse (15 mm). L'effet du traitement était jugé par un essai de panification après incorporation aux teneurs habituelles de la farine de fèves traitée dans la farine de blé témoin.

Ainsi, il a été possible de représenter la variation de l'activité blanchissante des farines de fèves en fonction de la température pour une durée donnée. La figure 1 montre cette évolution pour une durée de traitement de 12 heures en couche épaisse ; dans ce cas la température d'inactivation semble située vers 80°C.

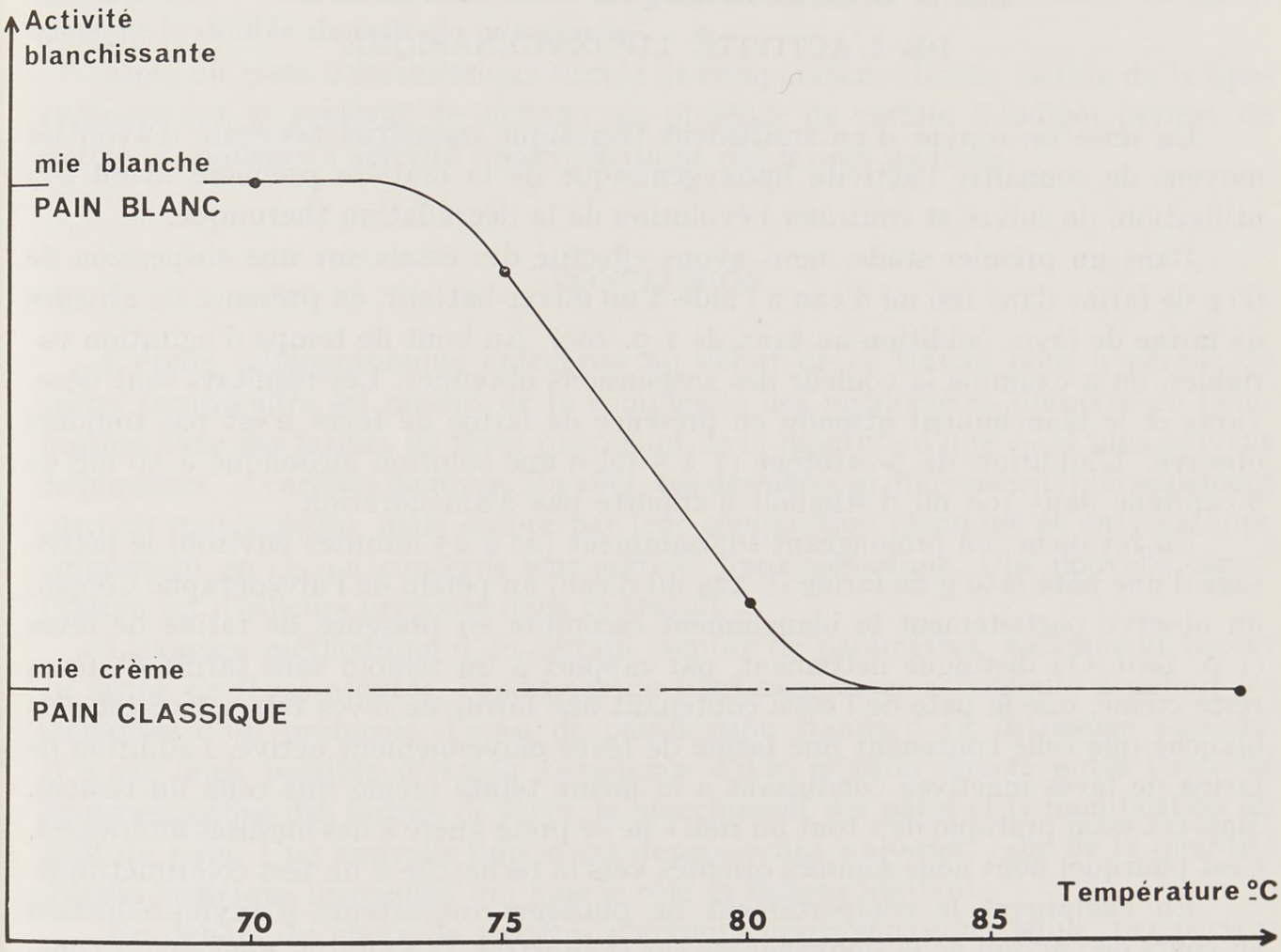


FIG. 1. — *Variation de l'activité blanchissante de la farine de fèves en fonction de son traitement thermique préalable* (farine de blé + 1,5 p. 100 de farine de fève Chine traitée 12 heures en couche épaisse 15 mm)

En traitant au niveau de 130°C pendant 10 minutes des farines de fèves de différentes origines (Chine, Maroc, Égypte), on peut conclure à leur inactivation totale par suite de l'absence de tout effet blanchissant au cours de la panification. Les dosages de la lipoxygénase montrent l'absence de toute activité. Ces résultats se sont trouvés confirmés depuis par les travaux de BEAUX (1970) qui a étudié de façon approfondie la cinétique d'inactivation thermique de la lipoxygénase.

Dès l'obtention de nos premiers résultats, un procédé de traitement thermique a été étudié ; il existe actuellement sur le plan industriel.

Ainsi, il est possible, par un traitement thermique approprié (durée et température convenables), de détruire l'activité lipoxygénasique des farines de fèves. Les farines traitées utilisées dans les mêmes conditions que les farines de fèves ordinaires (taux voisin de 1 p. 100) conduisent, sans aucune modification du diagramme

de panification, à un pain de mie plus crème et plus sapide. Au cours de ce traitement, les qualités améliorantes habituellement reconnues aux farines de fèves apparaissent dans l'ensemble préservées ; tous les essais pratiqués en fournil jusqu'ici tendent à le démontrer. Des travaux sont actuellement entrepris pour préciser et comparer les qualités améliorantes des farines de fèves, traitées et non traitées.

ESSAI COLORIMÉTRIQUE D'APPRÉCIATION DE L'ACTIVITÉ LIPOXYGÉNASIQUE

La mise en œuvre d'un traitement thermique industriel nécessite d'avoir les moyens de connaître l'activité lipoxygénasique de la matière première avant son utilisation, de suivre et contrôler l'évolution de la dégradation thermique.

Dans un premier stade, nous avons effectué des essais sur une suspension de 60 g de farine dans 100 ml d'eau à l'aide d'un mixer-batteur, en présence ou absence de farine de fèves (addition au taux de 1 p. 100). Au bout de temps d'agitation variables, on a examiné la couleur des suspensions obtenues. Les résultats sont décevants et le blanchiment attendu en présence de farine de fèves n'est pas toujours observé. L'addition de β-carotène (1 à 5 ml d'une solution alcoolique à 50 mg de β-carotène dans 100 ml d'éthanol) n'apporte pas d'amélioration.

En revanche, en prolongeant suffisamment (20 à 25 minutes environ) le pétrissage d'une pâte (250 g de farine + 125 ml d'eau) au pétrin de l'alvéographe Chopin, on observe parfaitement le blanchiment escompté en présence de farine de fèves (1 p. 100). On distingue nettement, par rapport à un témoin sans farine de fèves resté crème, que la pâte de l'essai contenant une farine de fèves très active est plus blanche que celle contenant une farine de fèves moyennement active, l'addition de farine de fèves inactivée conduisant à la même teinte crème que celle du témoin. Mais cet essai pratique de « tout ou rien » ne se prête guère à des mesures ultérieures, c'est pourquoi nous nous sommes orientés vers la recherche d'un test colorimétrique.

En examinant le comportement de plusieurs indicateurs d'oxydo-réduction au cours de l'action de la lipoxygénase sur le substrat de SURREY, nous avons constaté que le carmin d'indigo (sel disodique de l'acide 5-5′ indigo disulfonique) présente la propriété de passer du bleu à l'incolore. Cette propriété a été mise à profit depuis par HACHACHE (1972) et NICOLAS (1972).

L'enzyme est extraite dans un erlenmeyer de 100 ml en plaçant 3 g de farine de fèves et 30 ml d'eau distillée qu'on agite vigoureusement pendant 30 minutes à l'aide d'un agitateur magnétique. On centrifuge jusqu'à obtention d'un liquide clair.

Pendant ce temps, on prépare le substrat de SURREY (1964) (émulsion de linoléate de sodium en milieu tampon borate amenée à pH 7,5) et la solution de carmin d'indigo (250 mg de colorant par litre).

Dans une série de 5 tubes à essais, on introduit :

tube 1 : 5 ml de substrat + 1 ml colorant + 1 ml eau distillée (témoin),
tube 2 : — — + 1 ml extrait « Chine » (U.LPX = 180)
tube 3 : — — + 1 ml extrait « Pologne » (U.LPX = 98)
tube 4 : — — + 1 ml extrait « Maroc » inactivée
tube 5 : 6 ml eau distillée + 1 ml colorant.

Le tube n° 1 sert de témoin, le tube n° 5 donne la coloration après dilution au volume de l'essai.

Au bout de 2-3 minutes, le contenu du tube 2 s'est nettement décoloré, celui du tube 3 également, moins cependant que le précédent. Le contenu du tube 4 ne se décolore pas. Le témoin s'est légèrement éclairci.

A ce stade, il est donc possible de reconnaître qualitativement une farine de fèves inactivée d'une farine de fèves active. De plus, on différencie facilement « Chine » de « Pologne » dont le bleu disparaît moins vite (l'activité de la première est sensiblement le double de celle de la seconde).

Ainsi un essai colorimétrique simple de comparaison visuelle (action de la lipoxygénase sur le substrat de SURREY en présence de carmin d'indigo) permet de mettre en évidence l'activité lipoxygénasique des farines de fèves.

CONCLUSION

L'étude bibliographique entreprise au début de ce travail nous a permis de mieux comprendre les raisons de la complexité des phénomènes observés en panification avec des farines de fèves provenant de la mouture d'une — et plus souvent de plusieurs — variétés de fèves. En effet, ces dernières se différencient non seulement par leur morphologie, mais encore par leur composition chimique et enzymatique, notamment en ce qui concerne leur activité lipoxygénasique. Une nouvelle classification est d'ailleurs proposée dans ce travail.

L'examen méthodique d'un certain nombre de paramètres, notamment teneur en farine de fèves ajoutée, conditions de pétrissage, nous a conduits à définir les modalités d'un protocole d'essai de panification standard en pétrissage accéléré. Il a été ainsi possible d'établir l'existence d'une relation directe entre l'activité lipoxygénasique des farines de fèves, le blanchiment des pâtes et la modification du goût du pain. Une nouvelle notion est depuis venue s'ajouter, celle de la quantité d'acide linoléique disponible qui joue le rôle de facteur limitant.

En dehors du choix de variétés d'activité lipoxygénasique faible, perspective peu réaliste, le remède aux effets reprochés aux farines de fèves réside dans un traitement thermique approprié qui atténue ou annule l'activité lipoxygénasique tout en respectant l'effet améliorant au niveau des quantités plastiques et fermentatives des farines boulangères.

Enfin, l'action d'un extrait aqueux de farines de fèves sur une émulsion de linoléate de sodium en présence de carmin d'indigo constitue un test technologique simple, facile à mettre en œuvre industriellement, qui permet d'apprécier l'activité lipoxygénasique d'une farine de fèves donnée ou de contrôler son traitement thermique.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier très vivement ici M. DRAPRON et M. BEAUX de la Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A. Massy, qui nous ont apporté un précieux concours dans le domaine analytique, notamment par les mesures d'activité lipoxygénasique, et qui, par leur collaboration amicale, ont permis tout au long de cette étude de très nombreux et fructueux échanges de vue.

SUMMARY

EFFECTS OF LIPOXYGENASE ACTION OF THE BROAD BEAN ON THE CHARACTERISTICS OF DOUGHS AND BREAD

Using suitably standardized panification tests, we show that the excessive whitening of doughs and the unpleasant flavour of breads obtained by the « intensified kneading » method may be due to the lipoxygenase action of broad bean flours which have been added ($\leqslant$ 1.5 p. 100) to the wheat flours. This deterioration can be effectively remedied by using broad bean flours that have previously undergone an appropriate thermic treatment which without impairing the properties of improvement gives more easily kneaded doughs, better developed bread and reduces or destroys lipoxygenase activity. In this way, the doughs obtained whiten less and the bread has a palatable cream crumb similar to that obtained by conventional kneading in spite of intensified kneading being used. With a view to the industrial application of thermic treatment of broad bean flours, we have perfected a colorimetric test — action of an aqueous extract of broad bean flours on a sodium linoleate emulsion in the presence of carmine of indigo — by which the degree of lipoxygenasic activity of a given broad bean flour can be quickly estimated.

ZUSAMMENFASSUNG

EINFLUSS DER LIPOXYGENASEAKTIVITÄT DER SAUBOHNE AUF DIE EIGENSCHAFTEN VON TEIGEN UND BROT

Mit Hilfe von Standardbackversuchen wird gezeigt, dass das starke Bleichen der Teige und das unangenehme Brotaroma der mit Intensivknetung hergestellten Brote auf die Aktion der Lipoxygenase des hinzügefugten Bohnenmehles ($\leqslant$ 1,5 p. 100) zuzückzuführen ist. Diese Nachteile können vermieden werden, indem man die Lipoxygenase aktivität durch Hitzebehandlung des Bohnenmehles abschwächt oder vollständig aufhebt, ohne seine verbessernden Eigenschaften, wie leichtere Teigverarbeitung und Verbesserung des Brotvolumens, zu beeintrachtigen. Auf diese Weise wird das Bleichen der Teige vermieden und die Brotkrume ist Kremfarben und saftig wie bei den durch normale Teigknetung erhaltenen Teigen. Im Hinblick auf eine industrielle Anwendung der Hitzebehandlung der Bohnenmehle wurde eine kolorimetrische Methode ausgearbeiter, die es möglich macht, die Lipoxygenaseaktivität eines Bohenmehles auf schnelle Weise festzustellen. Sie beruht darauf, die Wirkung eines wässrigen Bohnenmehlextraktes auf eine Natriumlinoleatemulsion bei Anwesenheit von Indigocarmin zu bestimmen.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbayes H. (des), Chadefaud M., Ferre Y., (de), 1963. *Précis de botanique*, Masson éd., Paris.

Balls A. K., Axelrod B., Kies M. W., 1963. *J. Biol. Chem.*, **149**, 491-504.

Birdsong B. A., Alston R., Turner B. L., 1960. Distribution of canavanine in the family leguminosae as related to phyletic groupings. *Canad. J. Bot.*, **38**, 499-505.

Beaux Y., 1970. *La lipoxygénase de la fève (Vicia faba* L.). *Isolement et caractéristiques. Répercussions de son action en technologie boulangère.* (C. N. R. S. : A. O. 4554).

Bower F. O., 1923. *Botany of the living plant*, Mac Millan and Co. Ed.

C. N. E. R. N. A., 1962. La qualité du pain, t. 2, C. N. R. S. édit.

Crocker W., Barton L. V., 1966. *Physiology of seeds.* Chronica Botanica Cy. Waltham Mass., U. S. A.

Drapron R., Beaux Y., 1969. *C. R. Acad. Sci.*, **268**, 2598-2601.

Drapron R., Sclafani L., 1969. *Ann. Technol. agric.*, **18** (1), 5-16.

Dubois M., Étienne J.-J., 1970. *Compte rendu de fin de contrat D. G. R. S. T.* nº 68-01-228-00-212-75-01.

Eden A., 1968. A survey of the analytical composition of field beans *Vicia faba* L., **70**, 299-301.

Fox D. J., Thurman D. A., Boulter D., 1964. *Phytochemistry*, **3**, 417-419.

Guss P. L., Richardson T., Stahmann M. A., 1967. *Cereal Chem.*, (6), 607-610.

Hachache S., (travaux non publiés en 1972). Grandes minoteries à fèves de France.

Nicolas J., (travaux non publiés en 1972).

Picard J., 1953. Recherches sur la féverole. *Ann. Amél. Plantes*, **1**, 57-106.

Preusser E., 1966. Amines aliphatiques des graines, fruits et semences de *Vicia faba* et *Zea mays*. *Biol. Zbl.*, **85**, 19-27.

Reiser R., Fraps G. S., 1943. *J. Ass. off. agric. Chem.*, **26**, 186.

Rowlands D. G., Corner J. J., 1962. *Genetics of pigmentation in broad beans* (Vicia faba L.). Eucarpia, 3e Congr. Ass. Europ. Amél. Plantes, 229-34, C 155 d.

Sumner R. J., 1943. *Ind. Eng. Chem. Anal.*, Ed., **15**, 14-15.

Surrey K., 1964. *Plant physiology*, **39**, 65-70.

Young W. E., Gilles K. A., 1969. Communication au Meeting de l'A. A. C. C., Chicago.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 353-365.

RÉPERCUSSIONS DE L'ACTION DE LA LIPOXYGÉNASE EN PANIFICATION. DESTRUCTION DES ACIDES GRAS ESSENTIELS A L'ÉTAT LIBRE, DES CAROTÉNOÏDES ET DES TOCOPHÉROLS, ALTÉRATION DU GOÛT DU PAIN

R. DRAPRON*, Y. BEAUX*, M. CORMIER**
J. GEFFROY** et J. ADRIAN***

* *Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., Le Noyer Lambert, 91305 Massy*

** *Faculté de Médecine et de Pharmacie, Laboratoire de Matière médicale, 35000 Rennes*

*** *Laboratoire de Nutrition du C. N. R. S., 9, rue Émile, 92190 Bellevue*

RÉSUMÉ

En panification, lors du pétrissage intensifié des pâtes de farine de blé contenant de la farine de fève, l'action de la lipoxygénase provoque la disparition quasi complète de l'acide linoléique libre, acide gras essentiel quantitativement le plus important dans les farines de blé.

La présence d'un radical peroxydique libre au cours de la réaction enzymatique conduit à l'oxydation complète des pigments caroténoïdes et de la quasi totalité des tocophérols. Ces vitamines apparaissent ainsi particulièrement vulnérables en raison de leur caractère liposoluble, les vitamines B_1 et B_6, sensibles à l'oxydation, n'étant pas touchées.

Au cours du pétrissage conventionnel, la diminution de la teneur en ces différents constituants est faible par rapport aux pertes qui se produisent au cours du pétrissage intensifié.

Lors de la cuisson du pain, l'hydroperoxyde de l'acide linoléique est détruit avec formation d'hexanal, responsable vraisemblablement de l'altération du goût du pain.

L'ensemble des résultats obtenus montre que le pétrissage intensifié, incorporant à la pâte une grande quantité d'air et favorisant les contacts enzyme hydrophile-substrat hydrophobe, provoque un accroissement de l'activité de la lipoxygénase.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat nº 68-01-135-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

INTRODUCTION

Il a été déjà signalé que l'intervention de la lipoxygénase dans divers domaines de la technologie des grains de céréales et des graines de légumineuses pouvait conduire à une altération des caractères organoleptiques et nutritionnels des produits finis (Drapron et Uzzan, 1968). En panification par exemple, au cours du pétrissage intensifié de farine de blé contenant de la farine de fève, on observe un blanchiment des pâtes conduisant à l'obtention d'un pain ayant une mie exagérément blanche dont les caractères organoleptiques, l'arôme en particulier, sont altérés.

On a depuis longtemps émis l'hypothèse qu'une partie au moins de ces altérations était due à l'intervention de la lipoxygénase (C. N. E. R. N. A., 1962), enzyme qui existe en proportion beaucoup plus grande dans les farines de légumineuses que dans les farines de blé (Drapron et Uzzan, 1968). En outre, divers auteurs ont montré, par voie indirecte, qu'au cours du pétrissage d'un simple mélange de farine de blé et d'eau, l'oxydation partielle des acides gras à l'état libre est due à l'action de la lipoxygénase présente dans la farine, les qualités plastiques de la pâte étant fonction de cette oxydation (Smith et Andrews, 1957 ; Tsen et Hlynka, 1962 ; Graveland, 1968).

Compte tenu du mode d'action de cette enzyme et de la nature des produits de la réaction (radicaux peroxydiques libres en particulier), on peut estimer, *a priori*, que les oxydations portent essentiellement sur l'acide linoléique libre (quantitativement le plus important dans les farines de blé) ainsi que sur les constituants liposolubles (tout spécialement les caroténoïdes et les tocophérols) avec apparition de substances pouvant intervenir sur les caractères organoleptiques du pain.

Les travaux que nous présentons ici ont eu pour but de vérifier cette hypothèse et de savoir dans quelle mesure le mode de pétrissage (conventionnel et intensifié) avec ou sans farine de fève, influence l'action de la lipoxygénase vis-à-vis :

— des acides gras, en particulier des acides gras essentiels à l'état libre,
— des pigments caroténoïdes, comme le laisse prévoir le blanchiment des pâtes au cours du pétrissage intensifié,
— des tocophérols, présents dans la phase lipidique où a lieu la réaction,
— des deux vitamines B_1 et B_6 hydrosolubles, sensibles à l'oxydation, la vitamine B_1 l'étant seulement en milieu alcalin, tandis que la vitamine B_6 se comporte oxydable d'une façon plus générale.

Nous avons également examiné dans quelle mesure l'arôme du pain pouvait en être affecté.

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les pâtes sont préparées à partir d'un mélange d'eau, de chlorure de sodium, de levure et de farine de blé additionnée ou non de farine de fève, cette dernière ayant une activité lipoxygénasique environ 100 fois plus grande que celle de blé.

Pour l'étude de l'évolution des acides gras et des caroténoïdes, la farine pure de blé et celle contenant 0,5 p. 100 de fève ont des activités qui sont de l'ordre de 2,6 et 4,3 unités par g. Pour suivre l'évolution des tocophérols, des vitamines B_1 et B_6 et des constituants volatils, nous avons utilisé un mélange à 2 p. 100 de farine de fève ayant une activité de l'ordre de 7 unités par g. Bien que cette activité soit plus élevée que celle du mélange utilisé pour la première série d'expériences, la quantité d'acides gras essentiels oxydée est la même, la teneur en acides libres étant le facteur limitant de la réaction.

Deux types de pétrissage ont été effectués : un pétrissage intensifié au cours duquel l'énergie dépensée est de l'ordre de 40 joules par g de pâte et un pétrissage conventionnel pour lequel cette énergie est environ 4 fois plus faible.

Pour l'analyse des acides gras, des caroténoïdes et des tocophérols, les pâtes obtenues après pétrissage et après fermentation, ainsi que les mies des pains, sont cryodéshydratées puis stockées sous vide dans un emballage plastique à + 4°C, avant d'être utilisées.

La mesure de l'activité lipoxygénasique est effectuée par la méthode de Surrey (1964) qui consiste à doser spectrophotométriquement les diènes conjugués formés à partir d'acide linoléique. L'unité lipoxygénase (U.LPX) est définie comme la quantité de préparation enzymatique qui provoque la transformation d'une micromole d'acide linoléique par minute. On utilise comme coefficient d'extinction moléculaire de l'hydroperoxyde formé la valeur de 28 000. L'extraction des constituants lipidiques est effectuée par le mélange $CHCl_3$, CH_3OH, H_2O (1-2-0,8, V/V) suivant la technique décrite par Tsen, Levi et Hlynka (1962) permettant d'extraire la quasi totalité des lipides.

Les acides gras libres sont dosés par chromatographie en phase gazeuse en présence d'un étalon interne, après leur séparation globale des autres constituants lipidiques par chromatographie sur couche mince, suivie de leur transformation en esters méthyliques. La technique est adaptée de celle décrite par Drapron et Sclafani (1969) pour la mesure de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. Les acides gras totaux sont également dosés par chromatographie en phase gazeuse après méthanolyse des lipides en milieu alcalin.

L'évolution des pigments caroténoïdes est suivie par spectrophotométrie des extraits lipidiques dilués dans le cyclohexane (0,5 mg de lipides par ml). Les spectres d'absorption sont enregistrés entre 350 et 600 nm. La teneur en tocophérols des différents produits examinés est estimée colorimétriquement par la méthode de Tsen (1961) à partir de l'insaponifiable des lipides extraits selon la technique de Delsal (1944), utilisant un mélange de méthylal et de méthanol (4-1, V/V). Les tocophérols sont séparés par chromatographie en deux dimensions sur silicagel G, en utilisant comme solvant un mélange chloroforme-éthanol (90-10, V/V) en première dimension et un mélange éther de pétrole (40°C– 60°C) — éther diisopropylique (80-20, V/V) en deuxième dimension, selon Wittle et Pennock (1967).

L'évolution des vitamines B_1 et B_6 est étudiée selon les méthodes microbiologiques classiques.

L'extraction de la thiamine est réalisée par mise en suspension des produits dans de l'eau à pH 6. Après passage au bain-marie bouillant pendant 5 minutes, la suspension est tamponnée et amenée à pH 4,5. On ajoute alors un mélange de papaïne et de takadiastase, chaque préparation enzymatique étant introduite dans la proportion de 1/20 par rapport au poids d'échantillon traité. Après une incubation de 12 à 15 h à 35°C, la suspension est filtrée et le filtrat utilisé directement pour le dosage selon le principe de Sarret et Cheldelin (1944) rapporté par Adrian (1959) en utilisant *L. fermentum*.

L'extraction de la vitamine B_6 est réalisée par mise en suspension dans une solution acide (144 ml d'eau + 6,5 ml d'acide sulfurique 10 N) et traitement à 120°C à l'autoclave, pendant 2 h. Le pH est ensuite ajusté à 4,5 et la suspension filtrée, le filtrat obtenu est utilisé directement pour le dosage suivant la technique fondée sur les travaux d'Atkin *et al.* (1943) et décrite en détail par Adrian (1959). Le micro-organisme utilisé est *S. carlbergensis*, levure pour laquelle les trois formes de la vitamine B_6 (pyridoxine, pyridoxal, pyridoxamine) présentent une activité comparable (Snell et Rannefeld, 1945).

L'extraction des composés volatils de la croûte et de la mie des pains est effectuée par entraînement à la vapeur d'eau. L'eau est condensée à 0°C et les constituants encore volatils à cette température sont piégés à — 78°C puis analysés par chromatographie en phase gazeuse. Deux méthodes nous ont permis de caractériser certains des produits séparés, l'une fondée sur l'identité des temps de rétention de ces produits et de substances témoins, l'autre faisant intervenir l'action de réactifs spécifiques de divers groupes fonctionnels, selon Hoff et Feit (1966).

RÉSULTATS OBTENUS

Évolution des acides gras

Dans la figure 1, seules ont été représentées les variations de la teneur en deux acides gras à l'état libre, l'acide linoléique et l'acide palmitique, quantitativement le plus important des acides saturés des farines de blé. On observe que la teneur en ce dernier reste pratiquement constante au cours du pétrissage, que celui-ci soit intensifié ou non. Par contre, la teneur en acide linoléique accuse une diminution de l'ordre de 35 p. 100 après pétrissage conventionnel, diminution qui atteint 95 p. 100 environ après pétrissage intensifié. Au cours de la fermentation, la quantité d'acides libres reste pratiquement constante. Après cuisson, le déficit partiel observé doit être attribué à la formation, par effet thermique, de complexes lipoprotéiques ou glucidiques non extractibles par le système solvant utilisé (DRAPRON et FISHER, 1968). Nous avons constaté par ailleurs que l'évolution des acides stéarique et oléique est identique à celle de l'acide palmitique et que la teneur en acide linolénique varie parallèlement à celle de l'acide linoléique. En outre, les variations observées sur les teneurs en acides gras totaux (acides libres + acides estérifiés) traduisent seulement celles déjà indiquées pour les acides libres.

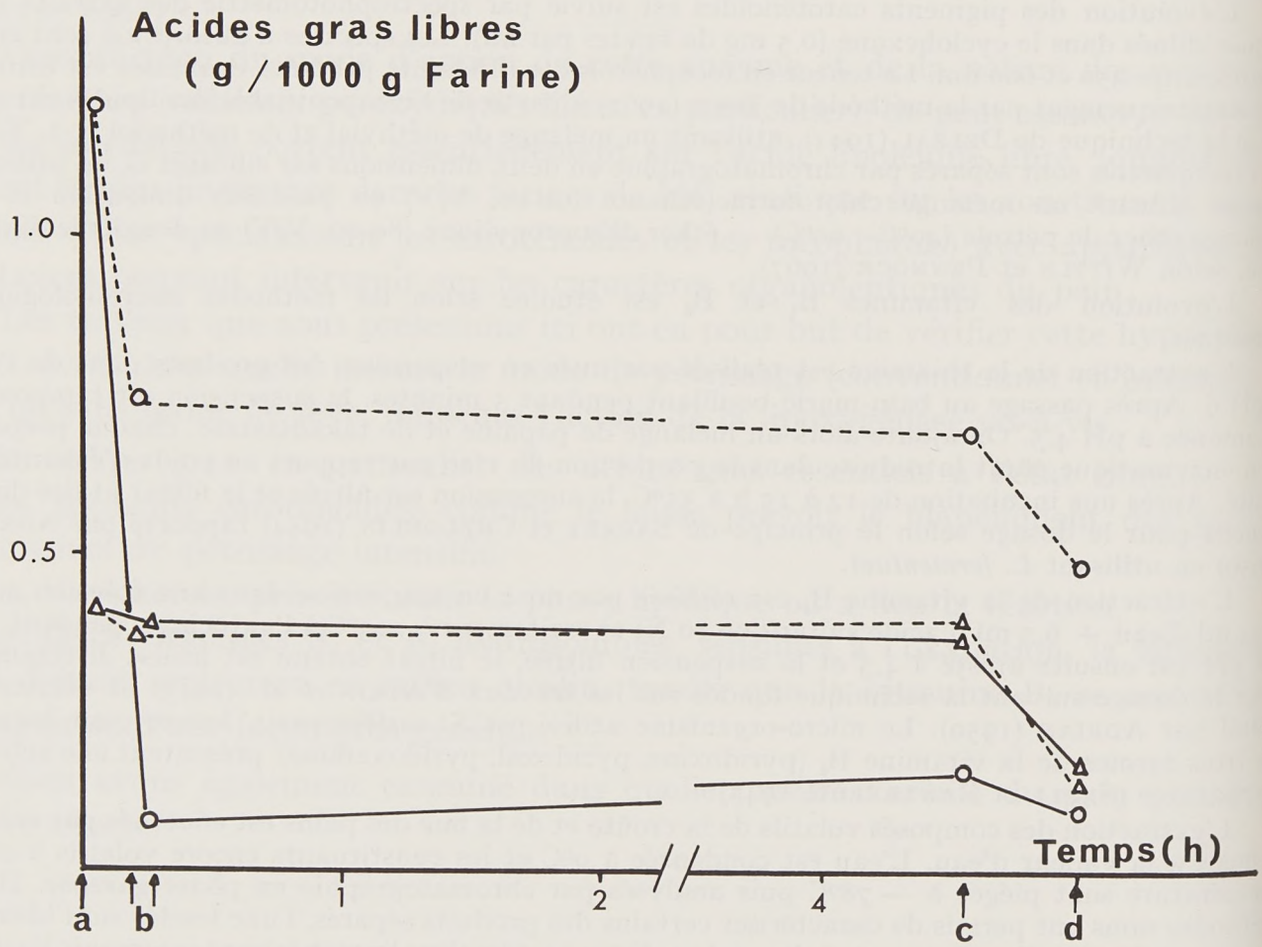


FIG. 1. — *Teneurs en acides linoléique et palmitique libres des milieux correspondant aux différents stades de la panification*

a : farine initiale — *c* : pâtes après fermentation
b : pâtes après pétrissage — *d* : mies des pains

Pétrissage conventionnel : ○------○ ($C_{18:2}$) ; △------△ (C_{16})
Pétrissage intensifié : ○——○ ($C_{18:2}$) ; △——△ (C_{16})

Évolution des pigments caroténoïdes

L'examen des spectres d'absorption des lipides dans le visible (fig. 2) montre que les pigments caroténoïdes sont pratiquement inaltérés au cours du pétrissage conventionnel, lors de la fermentation et de la cuisson, alors qu'ils disparaissent totalement lors du pétrissage intensifié, disparition qui évolue parallèlement à celle de l'acide linoléique. Pour une même activité lipoxygénasique, la substitution à la farine de fève d'un extrait aqueux de cette farine traité à 70°C pendant 6 minutes conduit à des résultats identiques. Il en est de même lorsqu'on utilise de la farine de fève ayant subi ce même traitement thermique, traitement susceptible, selon KIES *et al.* (1969), d'inhiber spécifiquement une carotène-oxydase éventuellement présente. Ces faits semblent donc exclure l'intervention de cette enzyme.

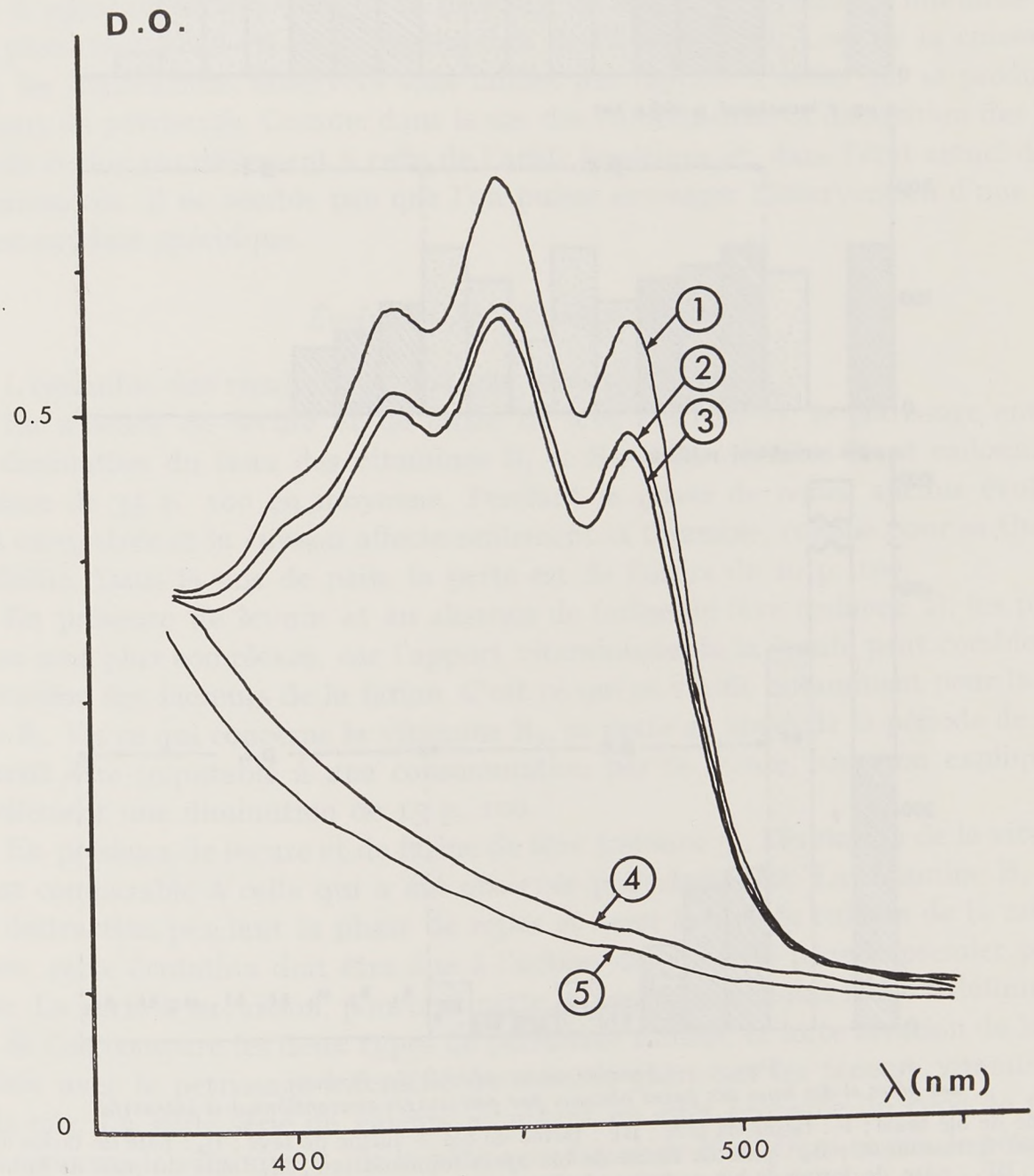


FIG. 2. — *Spectres d'absorption des lipides extraits de la farine* (1), *des pâtes après pétrissage conventionnel* (2) *et intensifié* (4) *et de la mie des pains correspondants* (3)-(5)

(0,5 mg de lipides par ml ; solutions dans le cyclohexane)

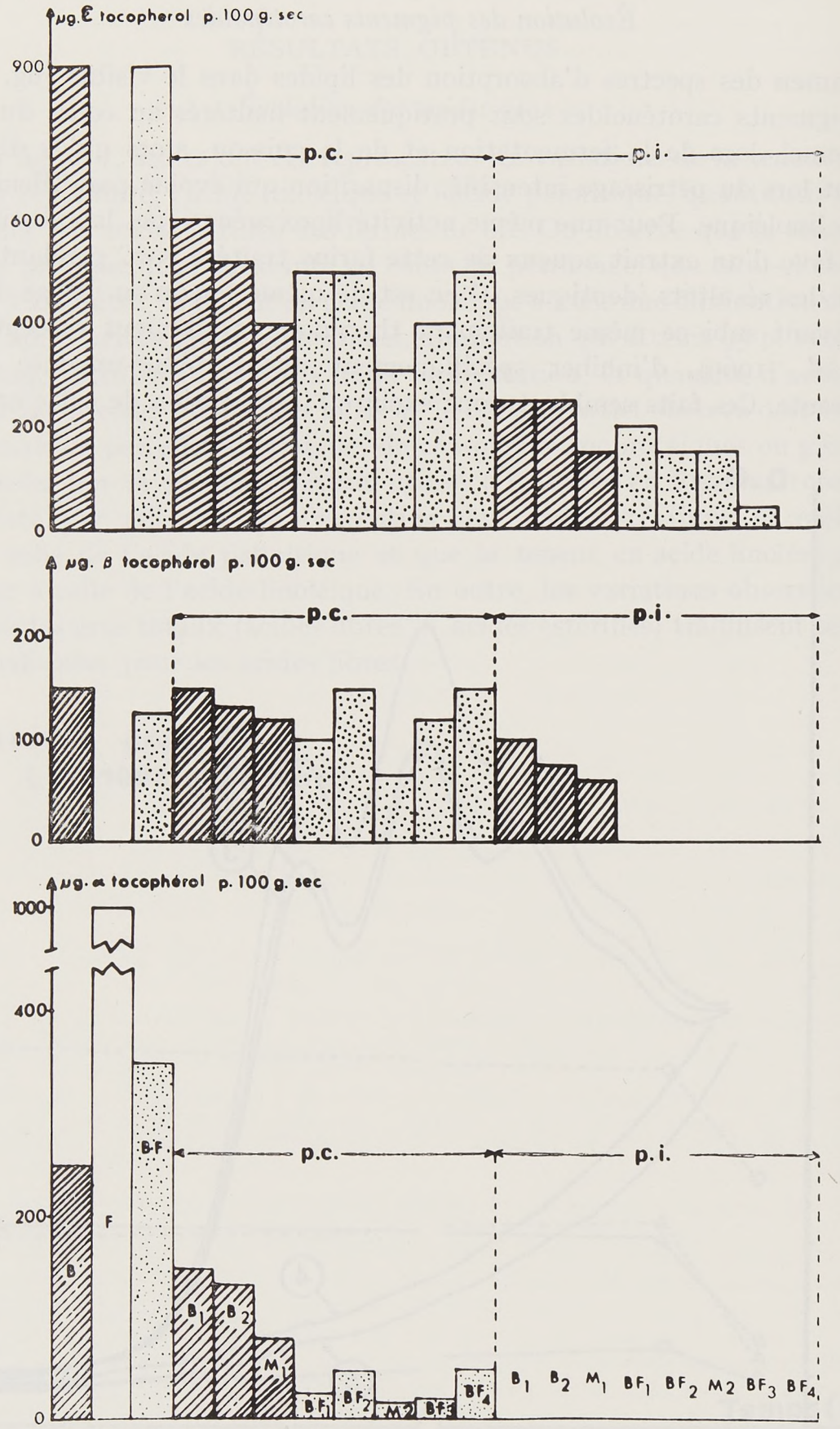


FIG. 3. — *Teneurs en tocophérols des farines, des pâtes et des mies des pains obtenus par pétrissages conventionnel et intensifié*

B : farine de blé seule ; F : farine de fève ; BF : farine de blé + farine de fève ; B_1 : pâte de farine de blé avant fermentation ; B_2 : pâte de farine de blé après fermentation ; M_1 : mie du pain de farine de blé ; BF_1 : pâte de farine de blé + farine de fève avant fermentation ; BF_2 : pâte de farine de blé + farine de fève après fermentation ; M_2 : mie du pain de farine de blé + farine de fève ; BF_3 : pâte de farine de blé + farine de fève, sans levure, après pétrissage ; BF_4 : pâte de farine de blé + farine de fève, sans levure, après repos. pc : pétrissage conventionnel ; pi : pétrissage intensifié.

Évolution des tocophérols

La figure 3 montre les variations des teneurs en α- et β-tocophérols et β-tocotriénol (βT_3 ou ε) des farines, des pâtes et des pains obtenus après pétrissages conventionnel et intensifié de la farine de blé, additionnée ou non de farine de fève (1). On constate qu'avec la farine de blé seule le pétrissage conventionnel conduit à une diminution de 40 p. 100 de la teneur en α-tocophérol des pâtes, le pétrissage intensifié provoquant sa destruction complète. Le β-tocophérol, bien que plus stable, disparaît totalement lors du pétrissage intensifié en présence de farine de fève. En ce qui concerne l'ε-tocophérol, sa teneur diminue de 30 et 45 p. 100, respectivement en absence et en présence de farine de fève, pour les pâtes obtenues par pétrissage conventionnel ; elle diminue de 72 et de 77 p. 100 dans le cas du pétrissage intensifié. Au cours de la fermentation, on n'observe pas de variations significatives mais il apparaît néanmoins que la présence de levure en pétrissage intensifié a un effet protecteur vis-à-vis de la destruction de l'ε-tocophérol. Lors de la cuisson du pain, les diminutions observées sont faibles par rapport à celles qui se produisent au cours du pétrissage. Comme dans le cas des caroténoïdes, la disparition des tocophérols évolue parallèlement à celle de l'acide linoléique et, dans l'état actuel de nos connaissances, il ne semble pas que l'on puisse envisager l'intervention d'une tocophérol oxydase spécifique.

Évolution des vitamines B_1 et B_6

L'ensemble des résultats est indiqué dans le tableau 1.

En absence de levure et de farine de fève (colonne 1), le pétrissage entraîne une diminution du taux des vitamines B_1 et B_6, cette dernière étant endommagée à raison de 35 p. 100 en moyenne. Pendant la phase de repos, aucune évolution n'est enregistrée et la cuisson affecte seulement la thiamine, connue pour sa thermosensibilité. Dans la mie de pain, la perte est de l'ordre de 10 p. 100.

En présence de levure et en absence de farine de fève (colonne 2), les phénomènes sont plus complexes, car l'apport vitaminique de la levure peut combler une destruction des facteurs de la farine. C'est ce qui se vérifie notamment pour la vitamine B_1. En ce qui concerne la vitamine B_6, sa perte au cours de la période de repos pourrait être imputable à une consommation par la levure, sinon on expliquerait difficilement une diminution de 15 p. 100.

En présence de levure et de farine de fève (colonne 3), l'évolution de la vitamine B_1 est comparable à celle qui a été observée précédemment. La vitamine B_6 subit une destruction pendant la phase de repos et aussi lors de la cuisson de la mie. Là encore, cette évolution doit être due à l'action de la levure pour le premier phénomène. La perte à la cuisson, pourtant nette, a une origine moins facile à définir.

Si l'on compare les deux types de pétrissage utilisés, la forte aération de la pâte réalisée avec le pétrissage intensifié ne retentit guère sur les teneurs vitaminiques de la mie. La seule série de valeurs montrant un effet probable du type de pétrissage concerne la vitamine B_6 de la pâte avec farine de fève. Dans ce cas, le pétrissage

(1) Seule, la farine de fève contient du γ-tocophérol (2 500 µg/100 g) ; seule également, la farine de blé contient de l'αT_3 tocotriénol (150 µg/100 g) ; ceux-ci n'ont pas été dosés par la suite ; le δ-tocophérol est absent dans les deux farines.

TABLEAU I

Évolution des teneurs en vitamines B_1 et B_6 au cours de différents types de panification
(teneurs exprimées en μ/g de produit sec)

	Panification de farine de blé sans fermentation			Panification de farine de blé avec fermentation			Panification de farine de blé en présence de farine de fève, avec fermentation		
	Pétrissage conventionnel (1)	Pétrissage intensifié (2)	Différences (1-2) (%)	Pétrissage conventionnel (3)	Pétrissage intensifié (4)	Différences (3-4) (%)	Pétrissage conventionnel (5)	Pétrissage intensifié (6)	Différences (5-6) (%)
Vitamine B_1									
Farines initiales	1,20 (100)	1,20 (100)		1,20 (100)	1,20 (100)		1,10 (100)	1,10 (100)	
Pâtes après pétrissage	1,05 (87)	1,05 (87)	0	1,25(—)	1,10 (92)	12	1,25 (—)	1,10 (100)	12
Pâtes après repos	1,05 (87)	1,00 (83)	5	1,20 (100)	1,05 (87)	13	1,10 (100)	1,10 (100)	0
Mies des pains	0,95 (79)	0,85 (70)	11	0,80 (66)	0,75 (62)	6	0,80 (73)	0,85 (77)	0
Vitamine B_6									
Farines initiales	2,25 (100)	2,25 (100)		2,25 (100)	2,25 (100)		2,10 (100)	2,10 (100)	
Pâtes après pétrissage	1,50 (67)	1,40 (62)	7	2,15 (96)	2,20 (98)	0	2,40 (—)	1,85 (88)	23
Pâtes après repos	1,50 (67)	1,40 (62)	7	1,85 (82)	1,85 (82)	0	1,80 (86)	1,60 (76)	11
Mies des pains	1,50 (67)	1,40 (62)	7	1,75 (78)	1,70 (76)	3	1,45 (70)	1,30 (62)	10

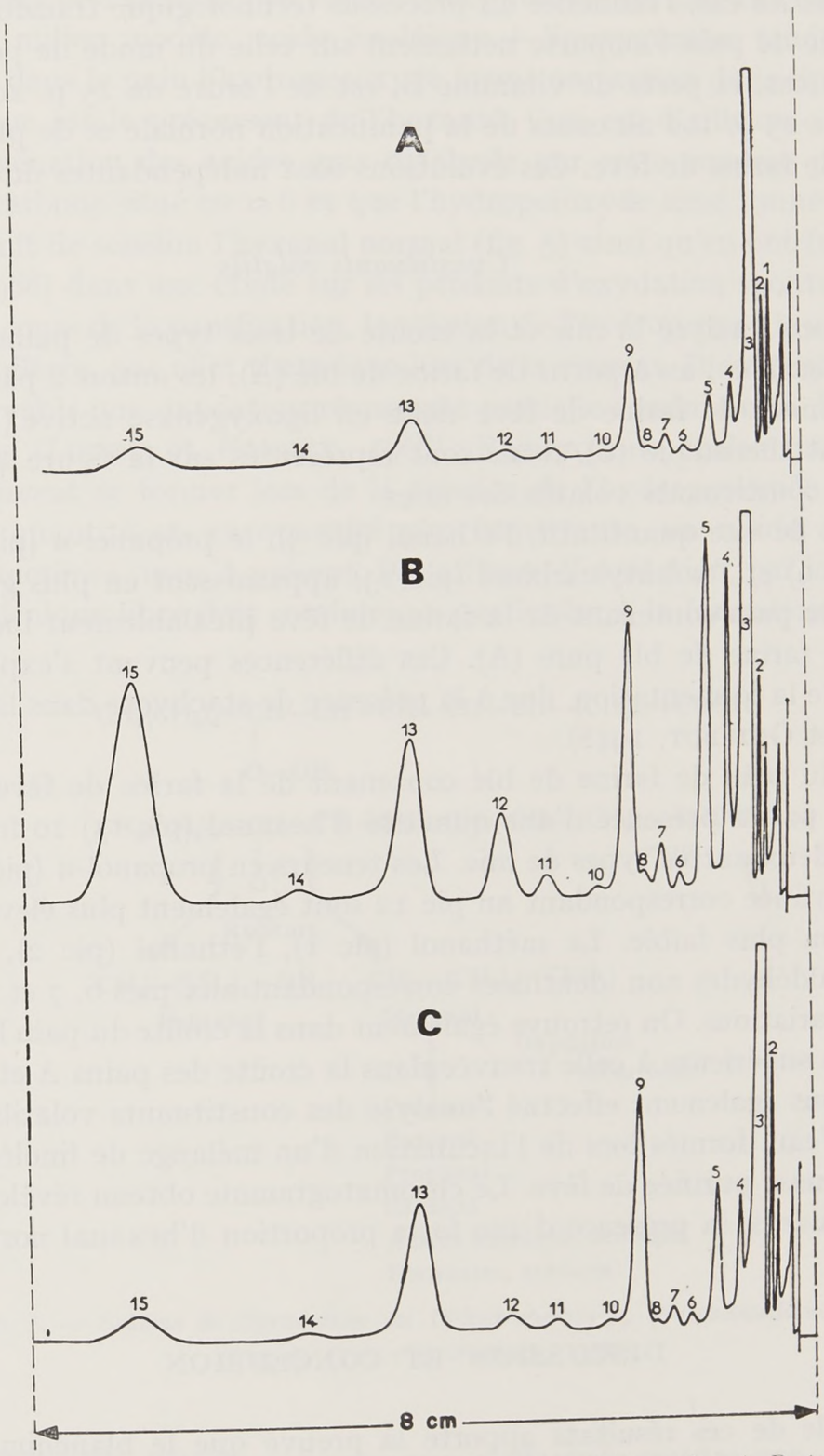


FIG. 4. — *Chromatogrammes des constituants volatils de la mie des pains A, B et C* (cf. texte)

Phase stationnaire : porapak Q (polyéthylvinylbenzène ; colonne : L = 3 m, ∅ = 4 mm ; gaz vecteur : N_2, débit = 40 ml/mn ; température = 170°C ; détecteur : ionisation de flamme ; chromatographe Aérograph, type 204. La nature du constituant 15 a été vérifiée par son temps de rétention sur colonne capillaire de Carbowax 1540.

intensifié entraîne une perte vitaminique supérieure à 20 p. 100. Toutes les autres différences enregistrées ne dépassent guère les marges de variation d'ordre analytique.

Dans tous les cas, l'influence du processus technologique transformant la farine initiale en mie de pain l'emporte nettement sur celle du mode de pétrissage. Ainsi dans tous les cas, la perte de vitamine B_1 est de l'ordre de 25 p. 100 ; la vitamine B_6 diminue de 25 p. 100 au cours de la panification normale et de plus de 30 p. 100 en présence de farine de fève. Ces évolutions sont indépendantes du type de pétrissage adopté.

Constituants volatils

Nous avons analysé la mie et la croûte de trois types de pains obtenus après pétrissage intensifié, l'un à partir de farine de blé (A), les autres à partir de la même farine additionnée de farine de fève riche en lipoxygénase active (B) ou inactivée par traitement thermique (C). Seuls sont représentés sur la figure 4 les chromatogrammes des constituants volatils des mies.

Du point de vue quantitatif, l'éthanol (pic 3), le propanol-*n* (pic 5), le méthyl propanol (pic 9) et l'isobutylcarbinol (pic 13) apparaissent en plus grande quantité dans la mie du pain contenant de la farine de fève préalablement inactivée (C) que dans celle de farine de blé pure (A). Ces différences peuvent s'expliquer par une accélération de la fermentation, due à la présence de stachyose dans la farine de fève (Guillemet et Guilbot, 1948).

La mie du pain de farine de blé contenant de la farine de fève « active » (B) se caractérise par la présence d'une quantité d'hexanal (pic 15) 10 fois plus grande que celle des deux autres types de mie. Les teneurs en propanol-*n* (pic 5) et en aldéhyde non identifiée correspondant au pic 12 sont également plus élevées, mais dans une proportion plus faible. Le méthanol (pic 1), l'éthanal (pic 2), le propanal-*n* (pic 4) et les aldéhydes non identifiées correspondant aux pics 6, 7 et 11 ne semblent pas subir de variations. On retrouve également dans la croûte du pain B une quantité d'hexanal très supérieure à celle trouvée dans la croûte des pains A et C.

Nous avons également effectué l'analyse des constituants volatils, entraînables à la vapeur d'eau, formés lors de l'incubation d'un mélange de linoléate de sodium et de lipoxygénase purifiée de fève. Le chromatogramme obtenu révèle, parmi divers autres constituants, la présence d'une forte proportion d'hexanal normal.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'ensemble de ces résultats apporte la preuve que le blanchiment des pâtes au cours du pétrissage intensifié de farine de blé en présence de farine de fève, ainsi que la modification des caractères de l'arôme du pain, doivent être attribués à l'intervention de la lipoxygénase.

Le pétrissage intensifié, incorporant à la pâte une grande quantité d'air et favorisant les contacts enzyme hydrophile-substrat hydrophobe, provoque un accroissement de l'action de la lipoxygénase qui se traduit par l'oxydation de l'acide linoléique libre, couplée avec celle des vitamines liposolubles par l'intermédiaire du radical peroxydique formé au cours de la réaction enzymatique.

Ce type d'oxydation apparaît donc essentiellement limité aux constituants de la phase lipidique puisque le pétrissage intensifié en présence de farine de fève n'affecte pratiquement pas les teneurs en vitamines hydrosolubles B_1 et B_6.

Les résultats de l'analyse des constituants volatils formés au cours de la panification ou en milieu modèle, acide linoléique + lipoxygénase, tendent également à prouver que dans le pain l'hydroperoxyde formé par action de la lipoxygénase sur l'acide linoléique est le précurseur de l'hexanal. Ceci est d'ailleurs confirmé par le fait que l'oxygénation des acides gras catalysée par cette enzyme porte essentiellement sur le carbone situé en ω 6 et que l'hydroperoxyde ainsi formé donne comme principal produit de scission l'hexanal normal (fig. 5) ainsi qu'en ont fait état Loury et Forney (1968) dans une étude sur les produits d'oxydation spontanée de l'acide linoléique. Au cours de la panification, la scission de l'hydroperoxyde a probablement lieu, ou est accélérée, par effet thermique lors de la cuisson. Il est probable que cette aldéhyde doit subir une oxydation récurrente partielle conduisant à d'autres constituants volatils (Loury et Forney, 1968). Remarquons également que d'autres substances peuvent se former lors de la scission de l'hydroperoxyde : du pentanol en très faible quantité et, en quantité plus importante, un résidu acide à chaîne longue non caractérisé jusqu'à présent. Par ailleurs, l'oxydation, par la lipoxygénase, de l'acide linolénique libre doit conduire en particulier à la formation d'hexénal.

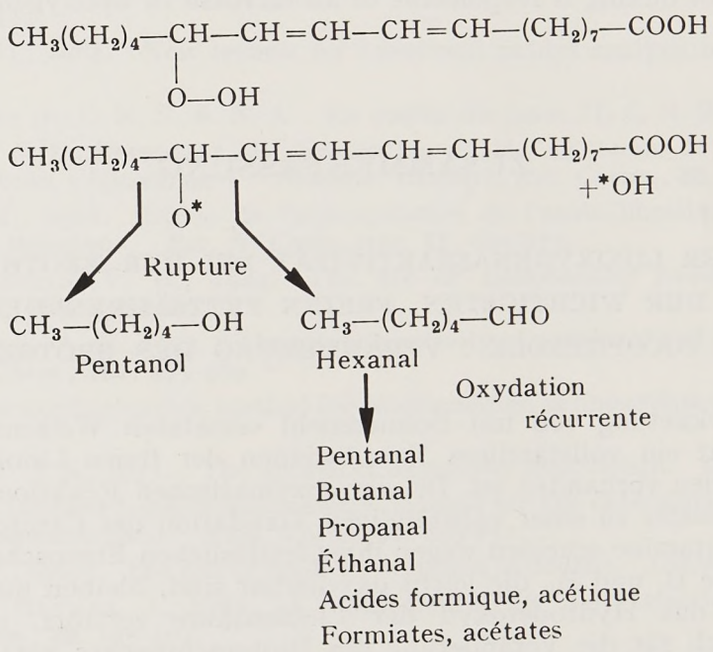


Fig. 5. — *Schéma de dégradation du 13-hydroperoxy-9, 11-octadécadiènoïque* (d'après Loury et Forney, 1968)

Quoi qu'il en soit, l'étude que nous avons effectuée montre que, dans les conditions de pétrissage intensifié utilisées actuellement, l'action de la lipoxygénase peut faire basculer l'équilibre des constituants participant à l'arôme du pain dans un sens défavorable au goût du consommateur.

Il est à prévoir qu'une connaissance approfondie des caractéristiques catalytiques de cette enzyme puisse conduire à mieux maîtriser son action, afin de préserver la valeur nutritionnelle et améliorer les caractères organoleptiques des produits de panification, tout en conservant son action bénéfique vis-à-vis des propriétés rhéolo-

giques des pâtes. Nos études se poursuivent actuellement dans ce sens, parallèlement à celles qui sont conduites en vue d'identifier les divers constituants, autres que l'hexanal, formés sous l'action de l'enzyme.

SUMMARY

LIPOXYGENASE ACTION DURING BREAD MAKING. DESTRUCTION OF ESSENTIAL FREE FATTY ACIDS, CAROTENOIDS AND TOCOPHEROLS. DETERIORATION OF THE FLAVOUR OF THE BREAD

In bread making with high speed mixing of the wheat flour doughs containing horse bean flour, lipoxygenase action causes the almost complete disappearance of free linoleic acid, quantitatively the most important essential fatty acid in the wheat flours. Free peroxydic radicals during the enzymatic reaction lead to the complete oxidation of the carotenoid pigments and of almost all tocopherols. These vitamins are destructed because of their liposoluble character; vitamin B_1 and B_6, sensitive to oxidation, are not affected. During baking of the bread, the hydroperoxyde of the linoleic acid is destroyed with the formation of hexanal, probably responsible for the deterioration in the bread flavour.

With low mixing of dough, decrease in amounts of these constituents are very low compared with those obtained with high speed mixing. All results show that high speed mixing increases air amount in dough and contacts between hydrophilic enzyme and its hydrophobic substrate. Therefore, this type of mixing is responsible of an increase in lipoxygenase activity.

ZUSAMMENFASSUNG

EINFLUSS DER LIPOXYGENASEAKTIVITÄT BEI DER BROTHERSTELLUNG : ZERSTÖRUNG DER WICHTIGSTEN, FREIEN FETTSÄUREN DER CAROTENOIDE UND DER TOCOPHEROLE : VERÄNDERUNG DES BROTGESCHMACKES

Bei der Intensivknetung von mit Bohnenmehl versetzten Weizenmehlteigen bewirkt die Lipoxygenaseaktivität ein vollständiges Verschwinden der freien Linolensäure, die in grosser Menge in Weizenmehlen vorhanden ist. Bei der enzymatischen Reaktion führt die Anwesenheit eines freien Peroxydrestes zu einer vollständigen Oxydation der Carotenoidpigmente und der Tocopherole. Diese Vitamine scheinen wegen ihrer fettlöslichen Eigenschaften besonders anfällig zu sein. Die Vitamine B_1 und B_6, die leicht oxydierbar sind, bleiben unberührt. Während des Backprozesses wird das Hydroperoxyd der Linolensäure zerstört, und Hexanal gebildet, welches wahrscheinlich für die Veränderung des Brotgeschmackes verantwortlich ist. Bei der konventionellen Knetung ist die Verminderung dieser verschiedenen Bestandteile im Vergleich zu der Intensivknetung sehr gering. Alle Ergebnisse haben gezeigt, dass die Intensivknetung, die dem Teig eine beachtliche Menge Sauerstoff zuführt und den Kontakt zwischen hydrophilem Enzym und hydrophobem Substrat fördert, einen Anstieg der Lipoxygenaseaktivität hervorruft.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Une partie de ces résultats a déjà fait l'objet d'un certain nombre de publications auxquelles le lecteur pourra se rapporter.

Beaux Y., 1970. *La lipoxygénase de la fève (Vicia faba* L.). *Isolement et caractéristiques. Répercussion de son action en technologie boulangère.* Thèse Docteur Ingénieur, Paris, n° C. N. R. S. : A. O. 4554.

DRAPRON R., BEAUX Y., 1969. Sur l'oxydation des acides gras essentiels par la lipoxygénase en panification et la formation de composés volatils intervenant dans l'arôme du pain. *C. R. Acad. Sc.*, **268**, 2598-2601.

DRAPRON R., BEAUX Y., CORMIER M., GEFFROY J., 1971. Sur l'oxydation enzymatique des tocophérols et des pigments caroténoïdes au cours de la panification. *C. R. Acad. Agric. Fr., février* 1971, 245-251.

DRAPRON R., 1973. Intervention de la lipoxygénase en panification. *Rev. fr. Corps gras*, **2**, 83-87.

ADRIAN J. 1959. Le dosage microbiologique des vitamines du groupe B. *Cahiers Techniques* (IV) *du C. N. E. R. N. A.*, C. *N. R. S.*, éditeur.

ATKIN L., SCHULTZ A. S., WILLIAMS W. L., FREY C. N., 1943. Yeast microbiological methods for determination of vitamins. Pyridoxine. *Eng. Ind. Chem. anal. Ed.*, **15**, 141-144.

DELSAL J.-L., 1944. Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal. Applications aux microdosages du cholestérol total, des phospho-aminolipides et des protéides. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **26**, 99-105.

DRAPRON R., FISHER N., 1968. Untersuchungen über die Lipide des Getreides. *Getreide u. Mehl*, **18** (1), 7-12.

DRAPRON R., UZZAN A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nutr. Alim.*, **22**, 393 B-436 B.

DRAPRON R., SCLAFANI L., 1969. Méthode de détermination de l'activité lipolytique des produits biologiques solides ou pâteux. *Ann. Technol. agric.*, **18** (1), 5-16.

GRAVELAND A., 1968. Combination of thin layer chromatography and gas chromatography in the analysis of a microgram scale of lipids from wheat flour and wheat flour doughs. *J. amer. Oil Chem. Soc.*, **45**, 834-840.

GUILLEMET R., GUILBOT A., 1948. Aspect physico-chimique de l'emploi des succédanés en panification. *Ann. Nutr. Alim.*, **2**, 479.

HOFF J. E., FEIT E. D., 1964. New technic for functional groups analysis in G. C. *Anal. Chem.*, **6**, 1002-1008.

JOURNÉES SCIENTIFIQUES DU C. N. E. R. N. A. *La qualité du pain*. II. C. N. R. S. Ed. 1962.

KIES M. W., HAINING J. L., PISTORIUS E., SHROEDER D. H., AXELROD B., 1969. On the question of the identity of soybean « lipoxidase ». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **36**, 312-315.

LOURY M., FORNEY M., 1968. Étude de l'autoxydation de l'acide linoléique aux températures de 20 et 40°C. II. Partie théorique. *Rev. fr. Corps gras*, **11**, 663-673.

SARRETT H. P., CHELDELIN V. H., 1944. The use of *Lactobacillus fermentum* 36 for thiamine assay. *J. Biol. Chem.*, **155**, 153-160.

SNELL E. E., RANNEFELD A. N., 1945. The vitamin activity of pyridoxal and pyridoxamine for various organisms. *J. Biol. Chem.*, **157**, 475-489.

SURREY K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxydase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

SMITH D. E., ANDREWS J. S., 1957. The uptake of oxygen by flour dough. *Cereal Chem.*, **34**, 323-336.

TSEN C. C., 1961. An improved spectrophotometric method for the determination of tocopherols using 4, 7-diphenyl-1, 10-phenanthroline. *Anal. Chem.*, **33**, 849-851.

TSEN C. C., HLYNKA I., 1962. The role of lipids in oxidation of doughs. *Cereal Chem.*, **39**, 209-219.

TSEN C. C., LEVI L., HLYNKA I., 1962. A rapid method for the extraction of lipids from wheat products. *Cereal Chem.*, **39**, 195-203.

WHITTLE K. J., PENNOCK J. F., 1967. The examination of tocopherol by two dimensional thin layer chromatography and subsequent colorimetric determination. *Analyst*, **92**, 423-430.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 367-373.

INHIBITION DE LA LIPOXYGÉNASE DE FÈVE PAR DES DÉRIVÉS DE L'HYDROQUINONE

J.-C. PALLA et J. VERRIER

Laboratoires de Recherches de la Société des Usines chimiques Rhône-Poulenc, 94400 Vitry sur Seine

RÉSUMÉ

L'activité de la lipoxygénase de fève purifiée est très fortement inhibée par certains dérivés de l'hydroquinone. Le pouvoir inhibiteur des 15 produits sélectionnés est plus élevé que celui de l'acide nordihydroguaïarétique, inhibiteur très puissant de la lipoxygénase de soja. L'un de ces produits, la S-(dihydroxy-2,5 phényl) isothiourée (20 257 R. P.), a été retenu pour des essais technologiques d'orientation : aux doses de 20 à 40 mg par kilogramme de mélange (farine de blé 99-farine de fève 1), il en inhibe partiellement l'activité lipoxygénasique mais n'apporte pas d'effet technologique décelable.

INTRODUCTION

La teneur en lipoxygénase de la farine de blé est assez faible (Drapron et Uzzan, 1968) et la « maturation » normale de la farine panifiable due à un certain niveau d'oxydation des acides gras est améliorée en France par l'addition de 1 p. 100 de farine de fève très riche en activité lipoxygénasique. Cette amélioration est actuellement remise en cause en raison de l'utilisation de plus en plus répandue du pétrissage intensif. En effet, au cours de ce pétrissage, l'absorption d'oxygène par la pâte est très importante et l'optimum de teneur en peroxydes correspondant à la bonne qualité des produits cuits est dépassé. On observe une modification importante de la structure de la pâte et un blanchiment trop poussé de la mie, ainsi que l'apparition de mauvais goût. D'autre part, on constate une diminution de la valeur nutritive du pain en raison de la disparition des acides gras essentiels et de certaines vita-

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 70-02-224-00-212-75-01 et 70-02-224-01-212-75-01) que nous remercions de son aide.

mines. Ces modifications de la qualité des produits cuits sont attribuées à une action excessive de la lipoxygénase au cours du pétrissage. Diverses méthodes sont préconisées actuellement pour limiter l'activité de l'enzyme. Elles sont pour la plupart fondées sur le traitement thermique ou hydrothermique des graines ou des farines de fèves. De telles méthodes sont efficaces en ce qui concerne l'inactivation de la lipoxygénase, mais difficiles à mettre en œuvre.

Un autre moyen de réduire l'impact de la lipoxygénase au cours de la panification est d'inhiber *in situ* dans la farine l'activité enzymatique à l'aide d'un inhibiteur spécifique dont l'emploi à des concentrations variées permettrait de limiter la production de peroxydes au cours du pétrissage intensifié. Divers auteurs ont montré qu'il existe de bons inhibiteurs des lipoxygénases de soja (YASUMOTO *et al.*, 1970) et de fève (BEAUX, 1970) mais leur toxicité empêche de les utiliser en panification. L'objet du présent travail a été de sélectionner des inhibiteurs très puissants de la lipoxygénase de fève purifiée, actifs sur le plan technologique et susceptibles d'être incorporés à la farine sans danger pour le consommateur.

I. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

A. — *Détermination de l'activité lipoxygénasique*

Le principe du dosage repose sur la mesure de l'absorption dans l'ultra-violet à 234 nm des hydroperoxydes formés par l'action de la lipoxygénase sur l'acide linoléique. Deux techniques ont été utilisées.

1. *Technique manuelle* (SURREY, 1964).

On fait agir à pH 9,0 et à 25°C une solution de lipoxygénase sur l'acide linoléique (0,005 M) en présence d'oxygène. La réaction est bloquée à l'aide d'éthanol à 96 p. 100. L'augmentation d'absorption due à la formation de peroxydes est alors mesurée contre un blanc. La cinétique de l'apparition de ces peroxydes est d'ordre zéro durant plusieurs minutes, ce qui permet facilement de relier l'activité de l'enzyme à sa concentration. L'unité de lipoxygénase est la quantité d'enzyme qui provoque l'oxydation d'une micromole d'acide linoléique par minute à 25°C.

2. *Technique automatique* (TAPPEL *et al.*, 1953).

La réaction est effectuée dans la cuve (1 cm de chemin optique) d'un spectrophotomètre enregistreur Gilford 2 400. Le substrat utilisé est l'acide linoléique 0,001 M (pH 9) et la température de réaction 25°C. On obtient ainsi des cinétiques linéaires à 234 nm. L'extrait enzymatique ajouté directement dans la cuve doit être incolore et les inhibiteurs étudiés sont solubilisés avant d'être introduits dans la cuve. L'activité enzymatique est exprimée comme dans le cas de la technique manuelle en unités internationales.

B. — *Purification de la lipoxygénase de fève*

La méthode employée est inspirée de la technique mise au point par BEAUX (1970). On met en présence 100 g de farine de fève et 660 ml de tampon acétate 0,1 M pH 4,5. Le mélange est agité durant 15 minutes à 25°C puis centrifugé. Le surnageant est alors concentré au 1/3 à 25° puis soumis à une filtration moléculaire sur Sephadex G-200 à pH 4,5 et 4°C. Avec une hauteur de colonne de 90 cm et un débit de 8 ml par heure, on obtient l'élution de l'activité lipoxygénasique sous forme d'une solution incolore qui peut être dosée par spectrophotométrie automatique. Dans ces conditions, l'activité spécifique moyenne de la solution purifiée obtenue est 780 unités par mg de protéines, ce qui correspond à un coefficient de purification voisin de 7.

C. — *Détermination du pouvoir inhibiteur des produits étudiés*

La détermination du pouvoir inhibiteur des produits est faite à l'aide de la technique spectrophotométrique automatique. Dans la cuve de dosage, on met en présence 0,33 unité de lipoxygénase purifiée par ml et des quantités croissantes du produit étudié. La différence des pentes des cinétiques de réaction en présence et en absence d'inhibiteur permet d'évaluer facilement le pourcentage d'inhibition. Chaque inhibiteur est caractérisé par sa concentration inhibitrice 50 p. 100 (CI_{50}) qui correspond au nombre de mg de produit par litre de milieu réactionnel qui inhibe 50 p. 100 de l'activité.

II. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

L'influence inhibitrice de 50 diphénols originaux appartenant à la famille de l'hydroquinone a été examinée par comparaison avec le pouvoir inhibiteur de l'acide nordihydroguaïarétique (NDGA) qui est connu comme l'inhibiteur le plus puissant de la lipoxygénase de soja (Yasumoto *et al.*, 1970). Quinze de ces diphénols possèdent un pouvoir inhibiteur vis-à-vis de la lipoxygénase de fève supérieur à celui du NDGA et sont moins toxiques. Ils inhibent tous l'activité lipoxygénasique selon une réaction à deux phases. Pour des concentrations très faibles en produit, on observe une inhibition assez importante (1re phase) qui diminue au bout d'un certain temps et même parfois s'annule (2e phase). Ce phénomène déjà observé (Beaux, 1970) au cours de l'inhibition de la lipoxygénase de fève par le BHT (di-*tert*-butyl-2,6 *p*-crésol) est décrit à titre d'exemple par la figure 1 dans le cas d'un des inhibiteurs étudiés, la S-(dihydroxy-2,5 phényl) *iso*thiourée (20 257 R. P.). Les concentrations inhibitrices 50 p. 100 des produits sélectionnés sont calculées en tenant compte de la deuxième phase qui correspond à l'inhibition la plus difficile à réaliser.

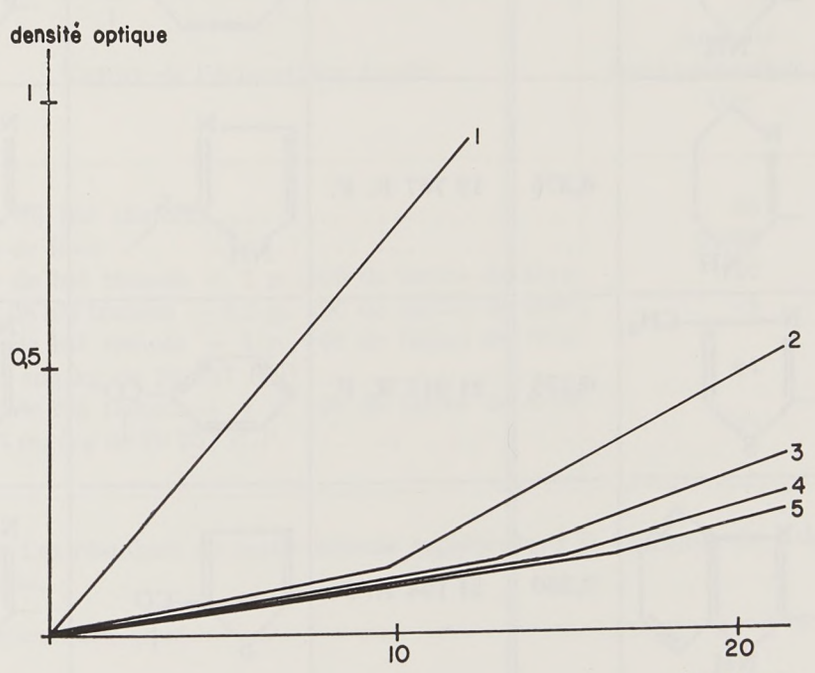


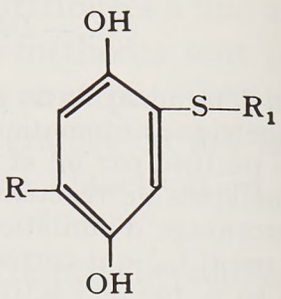
Fig. 1. — *Inhibition de la lipoxygénase de fève par le 20 257 R. P.*

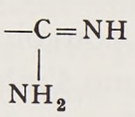
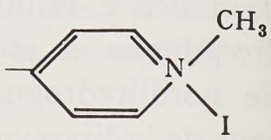
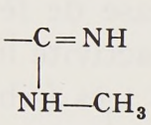
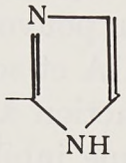
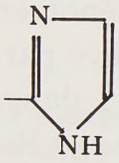
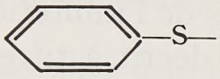
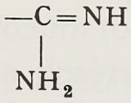
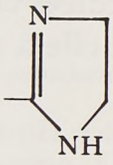
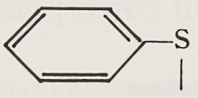
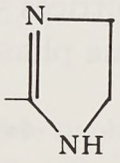
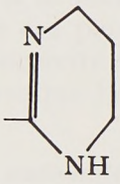
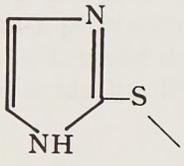
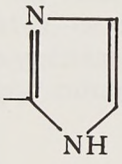
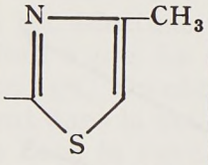
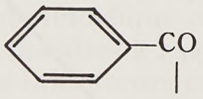
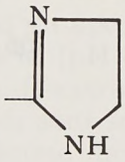
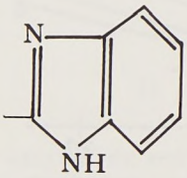
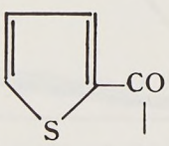
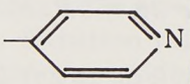
Courbe 1 : cinétique de réaction de l'enzyme purifiée.
Courbe 2 : cinétique de réaction en présence de 0,146 mg/l de 20 257 R. P.
Courbe 3 : cinétique de réaction en présence de 0,181 mg/l de 20 257 R. P.
Courbe 4 : cinétique de réaction en présence de 0,198 mg/l de 20 257 R. P.
Courbe 5 : cinétique de réaction en présence de 0,226 mg/l de 20 257 R. P.

TABLEAU I

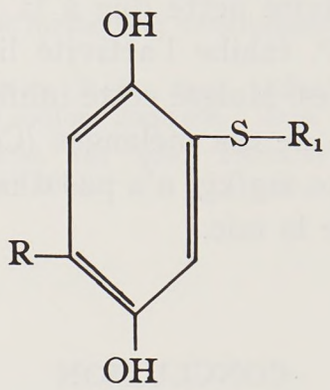
Activité sur la lipoxygénase de fève de dérivés de formule générale

(CI_{50} = concentration inhibitrice 50 p. 100)



N° du produit	R—	R_1–	CI_{50} (mg/l)	N° du produit	R—	R_1—	CI_{50} (mg/l)
20 257 R. P.	H—		0,143	20 600 R. P.	H—		0,390
20 516 R. P.	H—		0,196	21 201 R. P.	CH_3—		0,444
19 973 R. P.	H—		0,390	20 954 R. P.			0,497
20 258 R. P.	H—		0,125	20 961 R. P.			0,48
20 487 R. P.	H—		0,376	19 767 R. P.			0,510
21 233 R. P.	H—		0,276	21 017 R. P.			0,371
20 478 R. P.	H—		0,360	21 194 R. P.			0,240
20 527 R. P.	H—		0,175	Acide Nordihydroguaïarétique			0,520

Les dérivés de l'hydroquinone retenus ont pour formule générale :



Leur formule développée est donnée dans le tableau 1 ainsi que leur concentration inhibitrice 50 p. 100.

L'influence d'un de ces produits, la S-(dihydroxy-2,5 phényl) *iso*-thiourée (20 257 R. P.) sur l'activité lipoxygénasique d'un mélange panifiable de farine de blé et de farine de fève est décrite dans le tableau 2. Les mélanges « farine panifiable témoin » et « farine panifiable témoin + 20 257 R. P. » ont été réalisés par le laboratoire ARIA des Grands Moulins de Paris et l'activité lipoxygénasique de chaque mélange est déterminée après extraction sous agitation du mélange (5 g) par l'eau (50 ml) durant 45 minutes à 25°C.

TABLEAU 2

Activité lipoxygénasique
de mélanges farine de blé-farine de fève avec ou sans inhibiteur

Nature de l'échantillon étudié	Activité lipoxygénasique (1) U/g
Farine de blé témoin	26
Farine de fève	7 020
Farine de blé témoin + 1 p. 100 de farine de fève	100
Farine de blé témoin + 0,5 p. 100 de farine de fève	74
Farine de blé témoin + 1 p. 100 de farine de fève + 22 mg/kg de 20 257 R.P.	64
Farine de blé témoin + 1 p. 100 de farine de fève + 44 mg/kg de 20 257 R.P.	77

(1) Les résultats de cette colonne représentent la moyenne de 5 déterminations.

Les résultats obtenus mettent en évidence l'apport important au point de vue activité lipoxygénasique de la farine de fève dans les mélanges panifiables. Il existe une bonne concordance entre les activités des éléments séparés et celles des mélanges. Dans le cas des mélanges « farine de blé + farine de fève + 20 257 R. P. », l'inhibition produite n'est pas proportionnelle à la concentration de l'inhibiteur, proba-

blement en raison de la difficulté de réaliser des mélanges parfaitement homogènes. Cependant, la diminution d'activité nette due à la présence de l'inhibiteur permet de conclure que le 20 257 R. P. inhibe l'activité lipoxygénasique des mélanges de farine aux concentrations utilisées. Malgré cette inhibition, des essais technologiques de panification réalisés à l'aide de ces mélanges (Colas, 1972) ont montré que le 20 257 R. P., à la dose de 20 à 40 mg/kg, n'a pas d'influence décelable sur le volume du pain, la couleur et l'odeur de la mie.

CONCLUSION

La lipoxygénase de fève est fortement inhibée par les 15 dérivés de l'hydroquinone étudiés. L'un de ces dérivés, la S-(dihydroxy-2,5 phényl) *iso*-thiourée (20 257 R. P.) a été essayé en panification. Aux concentrations de 22 et 44 mg par kg de mélange de farine de blé (99 p. 100) et de fève (1 p. 100), on ne note pas d'amélioration de la qualité des produits cuits malgré l'existence d'une inhibition nette de l'activité lipoxygénasique du mélange de farines.

SUMMARY

INHIBITION OF BEAN LIPOXYGENASE BY HYDROQUINONE DERIVATIVES

The activity of purified bean lipoxygenase is greatly inhibited by certain hydroquinone derivatives. The inhibiting capacity of 15 selected products is greater than that of nordihydroguaïaretic acid, a very powerful inhibitor of soya lipoxygenase. One of these products, S-(dihydroxy-2.5 phenyl) isothiourea (20 257 R. P.),was retained for technical orientation tests : with doses of 20 to 40 mg per kilogram of mixture (wheat flour : 99 ; bean flour : 1), it partially inhibits lipoxygenasic activity but has no apparent technological effect.

SUZAMMENFASSUNG

INHIBIERUNG DER BOHNEN-LIPOXYGENASE DURCH HYDROCHINONDERIVATE

Die Aktivität der gereinigten Bohnenlipoxygenase wird durch bestimmte Hydrochinonderivate stark inhibiert. Das Inhibitionsvermögen von 15 selektionierten Produkten ist stärker als das der Nordihydroguajaretsäure, die ein starker Inhibitor der Lipoxygenase von Soja ist. Eines dieser Produkte, der S-dihydroxy-2,5 phenylisothioharnstoff (20 257 R. P.) wurde für technologische Orientierungsversuche verwendet. Bei Dosierungen von 20 bis 40 mg pro Kilogramm Mischung (Weizenmehl : 99-Bohnenmehl : 1) wird ein Teil der Lipoxygenaseaktivität inhibiert. Ein deutlicher technologischer Effekt konnte jedoch nicht beobachtet werden.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Beaux Y., 1970. *La lipoxygénase de fève. Isolement et caractéristiques. Répercussions de son action en technologie boulangère.* Thèse de Docteur-Ingénieur. Faculté des Sciences de Paris.

Colas A., 1972. Inhibiteurs de lipoxygénase (communication personnelle).

Drapron R., Uzzan A., 1968. Problèmes concernant l'activité lipolytique et lipoxygénasique des grains, graines et fruits oléagineux. *Ann. Nutr. Alim.* **22**, B 393-B 436.

Surrey K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

Tappel A. L., Lundberg, W. O., Boyer P. D., 1953. Effect of temperature and antioxydants upon the lipoxidase-catalysed oxidation of sodium linoleate. *Arch. Biochem. Biophys.*, **42**, 293-304.

Yasumoto K., Yamamoto A., Mitsuda H., 1970. Effect of phenolic antioxydants on lipoxygenase reaction. *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1162-1168.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 375-384.

LIPOXYGÉNASE ET PAIN FRANÇAIS

Influence de la lipoxygénase *in situ* et purifiée en panification

A. CHARGELEGUE

A. R. I. A.,
65, quai de la Gare,
75013 Paris

RÉSUMÉ

On traite de l'action sur l'odeur, la couleur et le volume du pain de farines de fève et de soja à activités lipoxygénasiques très différentes. Puis, à titre de comparaison, on étudie l'action de lipoxygénase purifiée extraite de la fève et du soja. En ce qui concerne les farines de fève et de soja, on peut constater que, pour des activités croissantes, la couleur passe progressivement du crème au blanc, l'odeur se détériore de plus en plus, le volume croit, passe par un optimum puis décroit.

Par contre, l'addition de lipoxygénase purifiée ne modifie ni la couleur et l'odeur de la mie, ni le volume du pain.

INTRODUCTION

Il est admis par un grand nombre d'auteurs que c'est bien la lipoxygénase, présente dans la farine de soja et dans la farine de fève, qui est responsable du blanchiment de la mie du pain, de la production de composés aromatiques parfois indésirables et de la modification des propriétés rhéologiques de la pâte (Haas et Bohn, 1934 ; Koch, 1956 ; Drapron, 1969). En France, où on utilise la fève en panification courante, on peut observer parfois, suivant les récoltes, une augmentation de volume sensible (1).

(1) Observation faite au fournil d'essais des Grands Moulins de Paris.

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-213-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

L'étude récente des variations d'activité lipoxygénasique des blés et de différents produits de mouture (Colas, Chargelègue, 1973) n'avait pas pour seul but la meilleure connaissance des blés et farines sur ce point précis. Il s'agissait en effet surtout de trouver des produits donnant des pains à mie blanche sans l'aide de farine de fève ou de soja, et ayant autant que possible bon goût. Les analyses ont donc été complétées par des essais de panification, tout au moins pour des valeurs d'activités extrêmes, pour tenter d'obtenir des pains à couleur et odeur aussi différentes que possible. Par la suite, nous avons étudié l'influence en panification de lipoxygénase apportée soit par les farines de fève ou de soja, soit isolée à partir de ces deux substrats.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

La méthode de détermination de l'activité lipoxygénasique est celle de Surrey (1954). En panification, nous avons utilisé une méthode de pétrissage dite intensifiée. Dans des pétrins Artofex type PHO, équipés de variateurs de vitesse, on met 2 kg de farine à laquelle on ajoute de l'eau en quantité suffisante pour obtenir une pâte « bâtarde » (1) (ni molle, ni ferme) puis de la levure à raison de 2 p. 100 du poids de farine. Cette incorporation de levure se fait au cours du frasage, qui dure 2 mn à une vitesse de 40 tours par minute. Nous pétrissons ensuite 15 mn à 70 tours par minute. Le sel (2,2 p. 100 du poids de farine) est mis 3 mn avant la fin du pétrissage. L'eau de coulage est à une température telle que la pâte atteigne 24°C en fin de pétrissage. Tous les essais comportent une addition d'acide ascorbique de 6 p.p.m. par rapport à la farine.

La première fermentation en cuve est de 1 heure à la température du fournil. La pâte est ensuite pesée puis façonnée en forme de « bâtard » (pain court à 3 coups de lame d'un poids de 350 g en pâte).

La deuxième fermentation, sur couche, dure 2 h 30 à 3 h 15. Elle a lieu à l'étuve, à 27°C et avec un degré hygrométrique suffisant (75 p. 100) pour éviter le croûtage des pâtes. La cuisson qui dure environ 20 à 25 mn se fait à 260°C. Le volume des pains est mesuré par déplacement de graines. On note aussi les caractéristiques des pâtes tout au long du travail, de même que celles du pain après cuisson, coup de lame, aspect de la mie (couleur, odeur)...

RÉSULTATS DE PANIFICATION

En règle générale, les farines obtenues à partir de variétés pures, ou les produits de mouture à activité faible, donnent, sans addition de farine de fève, des pains à mie crème ayant bonne odeur. Pour les activités fortes, la mie peut être assez blanche, voire même très blanche mais sans avoir mauvais goût. Cependant, pour les mêmes activités lipoxygénasiques, les résultats peuvent être différents comme l'indique le tableau 1.

Ce tableau concerne uniquement des variétés différentes cultivées parfois en plusieurs endroits. En fait, seul le cultivar *Atys* nous a fourni des farines qui blanchissent naturellement.

Ces résultats portant sur des variétés différentes, on ne peut donc pas établir une relation entre l'activité lipoxygénasique et le volume. Chaque farine ayant sa valeur boulangère caractéristique se comporte différemment au cours de l'essai de panification.

(1) Pour une farine de boulangerie classique, la consistance d'une pâte bâtarde est fixée par une hydratation comprise entre 60 et 63 p. 100 du poids de la farine telle quelle.

TABLEAU I

Influence de l'activité lipoxygénasique sur la couleur et l'odeur de la mie de pain obtenue à partir de farines de blés de variétés pures

Activités U.LPX/2 kg farine (1)	Variétés blés	Couleur (2)	Odeur (3)
1 290	*Cordial*	Crème	Bonne
2 075	*Rex*		
2 575	*Cadet*		
3 075	*Étoile de Choisy*		
3 290	*Champlein*		
1 675	*Rex*	Crème clair	Bonne
2 680	*Capitole*		
4 035	*Rendor*		
4 365	*Aronde*	Blanc crème	Bonne
2 220	*Atys*	Assez blanc	Bonne
3 575	*Atys*		
3 935	*Atys*		
4 960	*Atys*		
2 860	*Aronde*	Blanc mat	Bonne
4 035	*Atys*		
5 290	*Atys*	Très blanc	Bonne
2 720	Témoin panifiable + 1 p. 100 farine de fève.	Blanc	Fade

(1) U.LPX (unité lipoxygénasique) : cette unité est définie comme la quantité d'enzyme qui provoque en une minute à 25°C l'oxydation d'une micromole de linoléate.

(2) Il s'agit d'appréciation subjective de la couleur de la mie, les essais de mesure avec différents « colorimètres » ne nous ayant pas permis de chiffrer cette couleur. La gamme que nous avons retenue est la suivante en allant du crème au blanc : crème, assez crème, blanc crème, assez blanc, blanc, très blanc.

(3) Nous définissons empiriquement l'odeur de la mie de la façon suivante : bonne : c'est l'odeur du pain fait en pétrissage intensifié avec une farine de pur blé de pays sans ajout de farine de fève ; fade : la même farine additionnée de 1 p. 100 de farine de fève non traitée.

Nous avons fait figurer volontairement dans le tableau I les résultats obtenus avec une farine contenant 1 p. 100 de fève. Pour une activité relativement faible, on a un blanchiment très prononcé et une fadeur très marquée. Il est donc difficile de prévoir le blanchiment d'une variété donnée uniquement d'après son activité lipoxygénasique.

Dans un certain nombre d'échantillons, nous avons fait doser les acides gras libres pour voir si ces derniers, dont la teneur s'est révélée très variable, n'avaient

pas une influence sur le blanchiment de la mie pour une activité lipoxygénasique donnée (facteur limitant). Compte tenu du petit nombre d'analyses effectuées, la corrélation est difficile à établir.

INFLUENCE DE LA FARINE DE FÈVES

Nous avons utilisé trois farines de fèves, dont les échantillons nous ont été fournis par les Grandes Minoteries à Fèves de France : une farine à activité normale, 181 U.LPX/g, et deux farines dont l'activité, a été diminuée par traitement hydrothermique, une farine inactivée 1,54 U.LPX/g, une farine inactivée 2,19 U.LPX/g.

A. — *Farines de fèves actives*

Si on ajoute à une farine de blé un pourcentage croissant de farine de fèves, on observe que le volume des pains résultant passe par un maximum. De même, la couleur de la mie passe de crème à assez blanc puis à blanc et l'odeur s'affadit de plus en plus (tabl. 2).

TABLEAU 2

Action de doses croissantes de farine de fève sur l'odeur et la couleur de la mie

Essais	Activité U.LPX/2 kg farine	Écart de volume par rapport au témoin (p. 100)	Couleur	Odeur
Témoin	2 720	—	Assez crème	Bonne
T + 0,25 p. 100 fève	3 660	11	Assez blanc	Assez fade
T + 0,50 p. 100 fève	4 650	11,8	Assez blanc	Assez fade
T + 1 p. 100 fève	6 325	18,5	Assez blanc	Assez fade
T + 1,5 p. 100 fève	8 190	15,5	Blanc	Fade

Il faut remarquer que le maximum de volume du pain ne coïncide pas avec le maximum de blanchiment de la mie.

B. — *Farines de fèves inactivées*

Sur quatre farines de bases (*Capitole, Champlein* et deux farines boulangères obtenues à partir de blés de récoltes différentes), nous avons fait agir à la dose de 1 p. 100, le maximum quant au volume pour ces farines, la farine active et les deux farines inactivées.

Si l'on écarte les variations dans l'amélioration des volumes, variations normales car les farines qui n'ont pas les mêmes valeurs boulangères ne peuvent pas

donner la même réponse aux améliorants, on constate que, lorsque l'activité lipoxygénasique décroît par suite de l'inactivation progressive de la fève, l'augmentation de volume est moins sensible. De même, la couleur passe du blanc à crème et l'odeur devient bonne (tabl. 3).

TABLEAU 3

Action de farines de fève actives ou inactivées sur le volume et sur la couleur et l'odeur de la mie de pain fait à partir de différentes farines

Essais	Activité U.LPX/2 kg farine	Écart de volume par rapport au témoin (p. 100)	Couleur	Odeur
		Fève active		
A	5 820	+ 14,3	blanche	fade
B	5 820	+ 7	blanche	fade
C	6 325	+ 3,1 (1)	blanche	fade
D	6 040	+ 5	blanche	fade
		Fève inactivée 1		
A	3 300	+ 2,4	assez crème	bonne
B	3 300	+ 2,85	assez crème	bonne
C	3 810	— 11,2	assez crème	bonne
D	3 520	+ 1,32	assez crème	bonne
		Fève inactivée 2		
A	2 590	+ 1,2	crème	bonne
B	2 590	— 2,4	crème	bonne
C	3 090	— 5,9	crème	bonne
D	2 800	—	crème	bonne

(1) Cette farine ayant été stockée six semaines en sac, l'amélioration de volume est inférieure à ce qu'elle aurait dû être.

L'essai avec fève active confirme bien l'action améliorante de celle-ci, action qui est presque réduite à zéro pour la fève inactivée 1 à activité résiduelle non négligeable. Dans le dernier cas, le volume a tendance à diminuer. Cette réaction nous apparaît normale, la farine de fèves constituant alors une « charge » qui diminue la force boulangère de la farine.

INFLUENCE DE LA FARINE DE SOJA

Nous avons utilisé pour les essais deux sortes de farines de soja. L'une, entière, a une activité de 632 U.LPX/g, l'autre déshuilée a une activité de 219 U.LPX/g.

A. — *Farine de soja entière* (FSE)

Sur deux des farines témoins précédentes (C, D) nous avons fait agir la farine de soja entière à des doses de 0,25, 0,50 et 1 p. 100, comparativement à 1 p. 100 de farine de fève active.

A ce propos, il faut signaler que, sur le plan de l'activité lipoxygénasique, 1 p. 100 de fève active est pratiquement équivalent à 0,25 p. 100 de farine de soja entière. Comme l'indique le tableau 4, pour des activités équivalentes, les gains de volumes sont équivalents.

TABLEAU 4

Influence de l'addition de farine de soja entière sur le volume et sur la couleur et l'odeur de la mie

Essais	Activité U.LPX/2 kg farine	Écart de volume par rapport au témoin (p. 100)	Couleur	Odeur
C	3 000	—	crème	bonne
C + 1 p. 100 FA	6 580	+ 8,2	blanc un peu mat	fade
C + 0,25 p. 100 FSE	6 225	+ 7,7	blanc	très fade
C + 0,5 p. 100 FSE	9 450	+ 5,65	blanc	très fade
C + 1 p. 100 FSE	15 910	+ 2,9	blanc	très fade
D	2 435	—	crème	bonne
D + 1 p. 100 FA	6 040	+ 8,5	blanc un peu mat	fade
D + 0,25 p. 100 FSE	5 650	+ 7,15	blanc	très fade
D + 0,5 p. 100 FSE	8 900	+ 5,8	blanc	très fade
D + 10 p. 100 FSE	15 310	+ 6,7	blanc	très fade

FA : Farine de fève active ;
FSE : Farine de soja entière.

Si l'on augmente la dose de farine de soja entière pour atteindre des activités plus fortes, on constate comme pour la fève que le volume est moins amélioré.

Il faut remarquer cependant qu'à activité égale la farine de soja entière a toujours donné des pains à mie paraissant plus fade qu'avec la farine de fèves.

B. — *Farine de soja déshuilée* (FSD)

Là encore, pour une certaine valeur de l'activité lipoxygénasique, l'amélioration du volume est sensible. Au-delà, il y a une baisse très nette et on peut même constater que le produit ajouté nuit au volume (tabl. 5).

TABLEAU 5

Influence de la farine de soja déshuilée sur le volume et sur la couleur et l'odeur de la mie

Essais	Activité U.LPX/2 kg farine	Écart de volume par rapport au témoin (p. 100)	Couleur	Odeur
C	3 000	—	crème	bonne
C + 1 p. 100 FA	6 580	+ 3,7	blanche	fade
C + 0,50 p. 100 FSD	5 220	+ 9,9	blanche	un peu fade
C + 0,75 p. 100 FSD	6 325	+ 7,2	blanche	fade
C + 1 p. 100 FSD	7 440	— 4,7	blanche	très fade

ACTION DE LIPOXYGÉNASES PURIFIÉES

Nous avons utilisé trois lipoxygénases :

— une lipoxygénase de fève, préparée par BEAUX au C. E. R. D. I. A. Cette enzyme, en solution, n'était pas complètement pure et son activité était de 715 U.LPX/g ;

— deux lipoxygénases de soja, en provenance de la Sigma Chemical Company aux U. S. A. ;

type I : lyophilisée sur un support de chlorure de sodium pour permettre la solubilisation dans l'eau, activité 94 000 U.LPX/g ;

type II : en poudre également mais avec une activité de 5 750 U.LPX/g.

A. — *Lipoxygénase de fève*

Nous avons ajouté au pétrissage 5 ml de solution de lipoxygénase de fève de manière à avoir une activité calculée équivalente à celle obtenue avec 1 p. 100 de farine de fève active. Le volume, la couleur et l'odeur du pain ne sont en aucune façon modifiés (tabl. 6).

B. — *Lipoxygénase de soja*

Nous avons procédé de la même manière, mais en incorporant l'enzyme à l'état sec et en comparant l'essai avec les meilleurs résultats des séries précédentes. Les résultats ont été tout aussi négatifs que précédemment (tabl. 6). Par la suite, nous avons repris les essais avec les deux lipoxygénases à doses équivalentes et doublées, mais après mise en suspension dans l'eau juste avant le pétrissage. Enfin, nous avons ajouté à la solution enzymatique de l'acide linoléique (c'est-à-dire son substrat) soit tel quel, soit après chauffage de ce dernier. Ces essais, comme les précédents, n'ont conduit ni à un blanchiment ni à une augmentation de volume comme on aurait pu s'y attendre.

TABLEAU 6

Influence de la lipoxygénase purifiée (Fève et Soja) *sur le volume, sur la couleur et l'odeur de la mie*

Essais	Activité U.LPX/2 kg farine	Écart de volume par rapport au témoin (p. 100)	Couleur	Odeur
		Lipoxygénase de fève		
A	5 790	+ 6,4	crème	bonne
B	5 790	— 6,4	crème	bonne
C	6 290	— 1,4	crème	bonne
D	6 010	+ 2,3	crème	bonne
		Lipoxygénase de soja		
C	3 000	—	crème	bonne
C + 1 p. 100 FA	6 580	+ 5,4	blanc mat	fade
C + 0,25 p. 100 FSE	6 225	+ 2,6	blanc brillant	fade
C + 0,50 FSD	5 220	+ 2,1	blanc brillant	fade
C + 0,5 mg LPX, type II	5 940	— 4,2	crème	bonne

CONCLUSION

Il y a trois points à retenir.

Les blés ou farines peuvent avoir des activités lipoxygénasiques très différentes sans pour autant présenter des différences en panification. Seule une variété, *Atys*, a parfois le pouvoir de blanchir naturellement et son activité lipoxygénasique est en général très élevée.

L'addition de lipoxygénase *in situ* (farine de fève ou de soja) conduit à un blanchiment d'autant plus prononcé que la dose ajoutée est plus forte ; par contre, l'augmentation de volume passe par un maximum quand l'activité croît. Enfin, l'activité globale, farine plus fève, est bien inférieure à l'activité des farines blanchissant naturellement.

L'addition de lipoxygénase purifiée, avec ou sans son substrat, n'apporte aucune modification aux qualités des pains, ceci pouvant être expliqué soit par une très faible stabilité de l'enzyme (dans le cas de la lipoxygénase de fève surtout) soit par le fait que la purification de l'enzyme a conduit à l'élimination d'une autre « substance » nécessaire au blanchiment des pâtes.

Cependant, d'autres points demeurent obscurs et il serait intéressant de préciser pourquoi et comment le volume des pains passe par un maximum au lieu d'atteindre un palier. Cela conduirait, sans doute, à séparer l'action améliorante de la lipoxygénase (liée ou non à d'autres substances, enzymatiques ou non) de l'action propre, peu connue, de la farine et à les recombiner ensemble dans des proportions variables.

Il faut noter que le maximum de volume n'est pas obtenu chaque année avec des

doses de farines de fèves équivalentes, ce qui, à notre avis, amène au moins deux explications, indépendantes ou non : l'activité lipoxygénasique des farines de blé et des farines de fèves peut varier, aussi l'activité globale minimum est-elle obtenue avec des dosages différents ; ou bien la qualité des blés, donc celle des farines, n'est pas constante d'une année à l'autre. On peut alors penser que ces dernières, en tenant compte entre autres de la teneur en gluten et de sa qualité, ne peuvent pas, malgré un traitement identique, être amenées à un niveau de qualité identique. Ceci est d'ailleurs vrai pour d'autres améliorants. Les oxydants, par exemple, n'ont pas la même action sur toutes les farines et, pour une même farine, il existe bien une dose optimale se traduisant par un volume maximum.

SUMMARY

LIPOXYGENASE AND FRENCH BREAD.
INFLUENCE OF *IN SITU* AND PURIFIED LIPOXYGENASE IN PANIFICATION

The effect on the odour, colour and volume of bread made with Bean flour and Soya flour is dealt with, the lipoxygenasic activity of Bean and Soya being very different. Then, the action of purified lipoxygenase extracted from Bean and Soya is studied comparatively. With regard to Bean and Soya flours it can be observed that for increasing activities : the colour changes progressively from cream to white, the odour deteriorates increasingly, the volume increases, reaches an optimum, then decreases.

On the other hand, addition of purified lipoxygenase changes neither the colour nor odour of the crumb, nor the volume of the bread.

ZUSAMMENFASSUNG

LIPOXYGENASE UND FRANZÖSISCHES BROT :
EINFLUSS DER LIPOXYGENASE *IN SITU*
UND VON REINER LIPOXYGENASE BEI DER BROTBEREITUNG

Es wurden der Einfluss von Bohnen-und Sojamehl unterschiedlicher Lipoxygenase-aktivität auf Geruch, Farbe und Volumen des Brotes untersucht. Die Wirkung der aus Bohnen und Sojaextrakt gereinigten Lipoxygenase wird vergleichend betrachtet. Bei Verwendung von Bohnen und Sojamehl kann bei zunehmender Aktivität folgendes beobachtet werden : Die Krumenfarbe wechselt zunehmend von cremfarben nach weiss, Der Geruch wird mehr und mehr beeinträchtigt, Das Volumen steigt bis zu einem Optimum und nimmt nach und nach ab.

Im Gegensatz hierzu wird bei Verwendung von gereinigter Lipoxygenase Keine Veränderung bezüglich Farbe, Geruch und Volumen beobachtet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Colas A., Chargelegue P., 1973. Activité lipasique et lipoxygénasique des blés et produits de mouture. *Ann. Technol. agric.*, 323-334.

Drapron R., Beaux Y., 1969. Sur l'oxydation des acides gras essentiels par la lipoxygénase (E. C. 1.13.1.13) en panification et la formation de composés volatils intervenant dans l'arôme du pain. *C. R. Acad. Sc.*, **258**, 2598-2601.

Haas L. W., Brohn R. N., 1934. *Bleaching bread dough.* USP 1, 957, 333-4-5-6-7 (in *Chem. Abstr.*, **28**, 4137).

Koch R. B., 1956. *Bakers Dig.*, **30** (2), 48.

Surrey K., 1964. Spectrophotometric method for determination of lipoxidase activity. *Plant Physiol.*, **39**, 65-70.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 385-389.

LIPOXYGÉNASE ET PAIN FRANÇAIS. NATURE ET ÉVOLUTION DU GOÛT DU PAIN FRANÇAIS

R. GUINET

École de Boulangerie et de Pâtisserie de Paris,
65, quai de la Gare,
75013 Paris

Bien que l'adage populaire reconnaisse que les questions du goût et de la couleur soient difficilement discutables, et bien que certains consommateurs « boudent » notre traditionnelle « baguette », je me garderai bien de m'associer à ceux qui regrettent le bon vieux pain d'autrefois. En parlant de l'évolution du goût du pain français, je voudrais très modestement tenter une analyse du marché actuel du pain pour mieux comprendre les réactions du consommateur à travers les modifications qui sont intervenues depuis une dizaine d'années dans ce domaine.

Il paraît important d'examiner en premier lieu comment le pain se consomme et surtout comment on peut en apprécier le goût.

CARACTÉRISTIQUE ET MODES DE CONSOMMATION DU PAIN

Si l'on considère le pain tel quel, consommé en l'état, c'est un assemblage de croûte et de mie dont les proportions sont variables : soit 10 p. 100 de croûte pour un pain de campagne et environ 40 p. 100 pour une baguette parisienne.

La croûte se caractérise par sa friabilité, plus exactement son croustillant influencé par son épaisseur et le degré de cuisson, par sa couleur et par son goût qui peut être plus ou moins caramélisé et aller jusqu'aux limites du brûlé. Quant à la mie, il faut tenir compte de sa porosité ; dans le cas du pain français, elle doit être aussi aérée que possible avec une majorité de gros alvéoles. La souplesse de ses parois, sa consistance au toucher, sont des éléments de qualité importants. La couleur de la mie, non perceptible au palais, mais perceptible à l'œil, influence nécessairement la dégustation.

Les caractéristiques de la croûte, comme celles de la mie, évoluent pendant le

Ce travail a été effectué avec l'appui financier de la D. G. R. S. T. (contrat n° 68-01-213-00-212-75-01) que nous remercions de son aide.

rassissement ; la croûte peut devenir dure et cassante, ou peut au contraire ramollir selon les conditions de conservation ; la mie, elle, peut perdre une partie de ses qualités mécaniques, s'émietter, sécher, et quand elle perd son eau, c'est souvent au « profit » de la croûte qui la fixe pour réaliser un équilibre hydrique sur l'ensemble croûte-mie du pain. Ce phénomène est particulièrement net quand le pain est mal cuit ou qu'il est conservé dans un endroit humide ou en emballage étanche. Enfin, pour la mie comme pour la croûte, on ne peut négliger de tenir compte de ses flaveurs dont nous aurons l'occasion de parler à nouveau.

Mais le pain, de nos jours, en France du moins, est rarement consommé en l'état ; il l'est plutôt comme support ou comme accompagnement. Comme support, il sert aux sandwichs ou aux tartines et bien souvent, comme il devient un produit « fonctionnel », il est tranché puis emballé pour la vente. Les alvéoles de sa mie doivent être aussi réguliers et aussi fins que possible, de façon à retenir une garniture telle que beurre ou confiture. Comme accompagnement, il doit être de préférence adapté aux aliments qui lui sont associés ; l'exemple le plus connu, qui correspond d'ailleurs plus à une habitude ou une routine qu'à une motivation gastronomique, c'est le pain de seigle dont on a fait le pain à huîtres. On observe à ce propos que certains aliments ont la propriété de faire ressortir les bons ou les mauvais arômes du pain.

ÉVOLUTION DE LA PANIFICATION EN FRANCE

Comme ces aliments qui ont bien changé au cours des siècles, notre pain s'est modifié peu à peu. A l'origine du métier, rien n'indique que la baguette puisse exister un jour : le mot boulanger ne vient-il pas de *boulens* qui évoque le façonnage en boule ? Ce n'est en effet qu'au XVIIe siècle qu'apparaissent les pains longs, tandis que les pains ronds subsistent longtemps après le début du XXe siècle. C'est précisemment au début du XXe siècle que se développent le pétrissage mécanique puis le travail à la levure qui coexiste avec le levain pendant de longues années. La cuisson se fait dans des fours maçonnés presque toujours chauffés au bois ou au charbon.

Une évolution a lieu entre les deux guerres et, si l'on fait le point en 1939, le pain de Paris est le plus apprécié pour son goût dit « de noisette », sa mie longue, très ouverte, de couleur crème très claire ; il est fait avec une farine relativement faible et blanche, la pâte est douce ou bâtarde, le pétrissage (mécanique) est lent et coupé de repos ; la fermentation exclusivement sur levure est longue (poolish ou direct).

On commence à installer des fours à vapeur dans les boulangeries les plus importantes. Dans le même temps, les vieux fours maçonnés sont équipés de brûleurs à mazout et à gaz. Puis ce sont les années de rationnement avec les farines complètes et... le souci de la quantité qui passe avant celui de la qualité. Cette situation se prolongera bien au-delà des années de guerre par un pain lourd, souvent indigeste, que le consommateur refuse avec juste raison au profit d'autres produits tels que la biscotte. C'est l'époque des farines à taux d'extraction élevé qui nécessite un pétrissage court et une fermentation rapide. Malheureusement, lorsque les farines redeviennent à peu près normales, les mauvaises habitudes sont prises.

C'est en 1956 que se produit une véritable révolution dans l'art de panifier après la découverte du pétrissage intensifié. Ce pétrissage, que l'on appelle d'abord rapide, car effectivement le bras du pétrin tourne deux fois plus vite, permet d'obtenir un pain beaucoup plus développé et beaucoup plus blanc ; ces deux qualités suffisent à en assurer le succès, car il répond au désir du consommateur, lassé par un pain de restriction, lourd, indigeste et à mie trop foncé. En quelques années, il se généralisera sur toute la France. Un seul détail a échappé : sa fadeur, ou plus exactement une dénaturation du goût qui en fait en réalité un produit nouveau, différent du véritable pain français.

Il est curieux de constater que cette évolution a été plus influencée par les techniques, les découvertes, les innovations, les inventions dans tous les domaines que par un désir du consommateur (que celui-ci exprime d'ailleurs peu ou mal).

ATTITUDE DU CONSOMMATEUR VIS-A-VIS DU PAIN

Tout d'abord, et alors qu'à l'étranger on parle toujours du pain français comme d'un cas particulier que l'on assimile uniquement à la baguette, il est presque superflu de se rappeler que les français sont loin d'avoir tous les mêmes goûts. Si, effectivement, la boulangerie parisienne cuit le plus gros de sa production en baguettes, le pain du Nord, au contraire, est un pain boulot, riche en mie à petits alvéoles : c'est le pain à tartines. Quant au boulanger de campagne qui porte le pain au hameau ou à la ferme, il sait que son client recherche un pain de bonne conservation ; c'est en général un pain façonné, encore fait quelquefois sur levain (même s'il y a un peu de levure !), bien levé, bien développé et bien cuit. Dans de nombreuses villes, on trouve cette même qualité de pain dans un format réduit allant jusqu'à la « flûte », cousine provinciale de la « baguette ».

Et parmi tous ces consommateurs, dans chaque région, dans chaque village, il y a la minorité de ceux qui préfèrent autre chose que le pain traditionnel, soit par souci de diététique, ou tout simplement par recherche du produit mieux adapté au mode de vie. A ce sujet, on a coutume de dire que les Français vont acheter leur pain deux ou trois fois par jour ; cela est d'autant plus vrai que le pain est plus riche en croûte ; la notion de « pain chaud » est surtout attachée à la baguette, dont la durée de vie est en réalité celle de la croûte (laquelle perd son croustillant plus vite que la mie ne devient rassie). Mais la « ménagère qui reste à la maison » ou qui dispose de personnel n'est plus la seule cliente du boulanger ; celle qui, exerçant un emploi, « fait ses courses » après son travail (et ne peut donc y consacrer autant de temps), a des motivations d'achat différentes ; elle exige du pain un aspect plus fonctionnel et notamment une durée de conservation plus grande ; la vogue du pain de campagne, qui, contrairement à ce que l'on dit, ne se consomme pas que pour le week-end, peut aussi s'expliquer en partie. C'est également la raison du développement, même modéré, de certains pains spéciaux, vendus tranchés, sous emballage.

A tout ceci s'ajoute le mode de consommation, qui va du sandwich pris rapidement au bar le midi en lisant le journal jusqu'à la dégustation recueillie du connaisseur gastronome.

Entre ces deux extrêmes, une majorité semble admettre un état de fait et ceci, à mon avis, est le plus grave, car insensiblement s'amorce une régression de consommation qu'il serait trop facile d'imputer aux conditions de la vie moderne. Je citerai à ce propos une anecdote.

Quand le procédé de panification en pétrissage intensifié est apparu en boulangerie, conscients de la modification du goût du pain, nous avons voulu en vérifier l'impact auprès des consommateurs. Pour cela, nous avons fait effectuer un test de dégustation comparé des deux types de pain (pétrissage en vitesse lente et pétrissage intensifié) par un jury spécialisé : 90 p. 100 des suffrages sont allés au nouveau pain blanc, léger bien qu'insipide. Compte tenu des griefs qui sont quelquefois fait à notre pain actuel (c'est-à-dire à ce même pain blanc, insipide), nous avons renouvelé ce même test de dégustation dans les mêmes conditions ; cette fois, 50 p. 100 des suffrages sont allés à chacun des pains.

Cette expérience montre en réalité que le consommateur, d'abord resté très sensible à l'idée que la blancheur du pain est associée à une amélioration de la qualité, remet en cause son premier jugement quand il prend conscience de l'altération qu'a subi le goût du produit.

En conclusion, il me semble que l'amélioration de la qualité du pain ne peut être que le résultat d'un effort collectif au niveau des différents stades de production mais auquel doit être associé le public, ne serait-ce que par l'information qui peut lui être donnée et qui devrait lui faire abandonner ces faux critères de qualité que sont le super développement du volume et le blanchiment, surtout s'ils ne peuvent être obtenus qu'au détriment du goût.

SUMMARY

LIPOXYGENASE AND FRENCH BREAD.
THE NATURE AND THE EVOLUTION OF THE FLAVOUR OF FRENCH BREAD

French bread is described as a « special case » of panification, the characteristics of which distinguish it from other known types of bread in the world. It is observed, however, that its high reputation in many countries at the present time is based upon qualities which have been evolving, in France, for some years. Without going right back and evoking « good old-fashioned bread », the evolution is outlined not only of the product but also of the conditions of manufacture influencing its flavour and consumer reaction :

— various aspects of the perception of the bread's flavour ;
— influence of panification methods on flavour ;
— consumer attitude towards the bread.

ZUSAMMENFASSUNG

LIPOXYGENASE UND FRANZÖSISCHES BROT :
NATUR UND ENTWICKLUNG DES BROTGESCHMACKES

Das französische Brot wird als ein « Sonderfall » der Brotherstellung angesehen dessen Eigenschaften sich von den anderen Brottypen unterscgeiden. Es muss edoch bemerkt werden dass die Vorzüge, die es augenblicklich in vielen Ländern geniesst, auf Eigenschaften bdruhen,

die in den vergangenen Jahren eine Entwicklung erlebt haben. Ohne auf den Ursprung und auf das « gute Brot von ehemals » zurückzugreifen, Kann man nicht nur eine Entwicklung des Brotes an sich feststellen, sondern auch eine Entwicklung in der Brotbereitung die seinen Geschmack beeinflussen und Reaktionnen seitens des Verbrauchers hervorrufen.

— Verschiedene Ansichten im Hinblick auf den Brotgeschmack ;
— Einfluss der verschiedenen Verarbeitungstechniken auf den Brotgeschmack ;
— Verhalten des Verbrauchers.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (3), 391-397.

L'EMPLOI DES ENZYMES DANS LES PAYS DE LA C. E. E.

Législation

Mme S. ROCHIZE

Service de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité,
42 bis, rue de Bourgogne,
75007 Paris

RÉSUMÉ

Jusqu'à ces dernières décennies, l'emploi des enzymes en alimentation était régi soit par les règles dites « de bonnes pratiques de fabrication », transmises par la tradition et éventuellement définies dans des codes d'usages professionnels, soit par les normes réglementaires définissant certaines catégories d'aliments ou de boissons.

Les développements récents et très rapides de l'industrie de production de préparations enzymatiques, le développement des recherches dans l'industrie alimentaire, notamment dans le domaine riche de possibilités d'utilisation des propriétés originales des enzymes, ont modifié la situation et rendent nécessaire l'élaboration d'une réglementation spécifique.

Dans tous les pays du Marché commun, les pouvoirs publics sont conscients de cette nécessité ; cependant, les quelques règlements promulgués en la matière ne constituent qu'une solution partielle. Les principes directeurs d'une solution plus complète pourraient être les suivants : les préparations enzymatiques commerciales sont considérées comme des additifs ; leurs critères d'identité et de pureté, les conditions de leur utilisation et les règles d'étiquetage doivent être définis.

INTRODUCTION

Pour présenter avec le plus de clarté possible la législation relative à l'emploi des enzymes en alimentation, il n'est pas inutile de rappeler tout d'abord quelques points d'histoire.

Il y a des milliers d'années que l'on utilise, pour la préparation des aliments, les propriétés des enzymes. Sans cette utilisation, beaucoup de nos aliments n'existeraient pas. Cependant, c'est seulement depuis une date relativement récente que des préparations riches en enzymes, telles les levures de boulangerie, sont l'objet d'une production distincte de la préparation des aliments, et d'un commerce ;

quant aux préparations enzymatiques commerciales actuelles, leur production ne remonte qu'à quelques décennies.

Il n'est pas inutile non plus de rappeler les caractères originaux des enzymes : les enzymes sont des catalyseurs organiques, à action spécifique, produites par des cellules vivantes, mais qui peuvent agir indépendamment de ces cellules ; elles existent naturellement dans un grand nombre d'aliments (ou de matières premières servant à la préparation des aliments).

Cependant, les préparations enzymatiques du commerce sont rarement constituées d'un seul composé chimique ; ce sont généralement des mélanges très complexes qui peuvent comporter plusieurs enzymes individuelles (le nombre et la nature de ces enzymes dépendent de la nature de la cellule productrice, du milieu et des conditions de culture), éventuellement des coenzymes nécessaires à l'activité de l'une ou l'autre des enzymes présentes, des résidus des cellules productrices et/ou du milieu de culture, enfin des supports ou additifs divers.

Il n'est pas inutile non plus de souligner l'importance actuelle du développement des connaissances en enzymologie, de l'industrie de production des préparations enzymatiques, des possibilités d'utilisation, en alimentation, de ces préparations.

Il n'est pas inutile, enfin, de rappeler deux des objectifs qui sont à la base de toute législation et/ou réglementation en matière d'aliments, à savoir : protéger la santé publique, assurer la loyauté de toute transaction.

RÉGLEMENTATION

Considérations générales

Toutes ces considérations expliquent que, jusqu'à ces dernières années, l'emploi des enzymes, en alimentation, était régi dans la plupart des pays par les dispositions législatives et réglementaires générales, par les règles, souvent dites de bonnes pratiques de fabrication, transmises par la tradition et éventuellement transcrites dans des codes d'usages professionnels, ou encore par les normes réglementaires définissant certaines catégories d'aliments (ou de boissons), tandis que d'autre part les normes (ou spécifications) relatives aux préparations enzymatiques pouvant être employées en alimentation étaient pratiquement inexistantes.

Les mêmes considérations expliquent le besoin actuel d'une réglementation spécifique et cohérente relative aux préparations enzymatiques destinées à l'alimentation, cette réglementation devant être cependant suffisamment souple pour permettre l'adaptation aux progrès techniques ; une telle réglementation est évidemment assez difficile à élaborer dans la pratique ; il semble qu'à ce jour aucune solution satisfaisante n'ait été trouvée.

Situation dans les pays de la C. E. E.

Très brièvement résumées voici, en ce qui concerne les enzymes pouvant être utilisées en alimentation, l'essentiel des dispositions réglementaires nationales dans les pays de la Communauté économique européenne.

France.

En France, il n'y a pas encore de réglementation spécifique.

Les dispositions générales de la réglementation sont cependant applicables et notamment celles qui concernent l'innocuité des aliments et l'interdiction de toute tromperie ou tentative de tromperie.

On peut considérer qu'il y a, dans la pratique, deux types de préparations enzymatiques :

1. Les préparations « traditionnelles », dont le type est la levure de boulangerie, dont l'emploi est régi par les bonnes pratiques de fabrication déjà évoquées et par les normes relatives à certaines catégories d'aliments, vins, bières, pains, fromages, etc.

2. Les préparations commerciales actuelles considérées comme des additifs et dont l'emploi n'est licite que dans le cas où un texte réglementaire l'autorise explicitement, ledit réglement pouvant définir en outre les critères de qualité, les conditions d'emploi, les règles d'étiquetage...

De tels textes sont aujourd'hui au nombre de trois :

— les deux arrêtés du 15 octobre 1957 autorisant, l'un l'emploi de « diastases » pectinolytiques pour la clarification des cidres et des poirés, et l'autre l'emploi de diastases amylolytiques et de diastases protéolytiques pour la clarification de la bière ;

— l'arrêté du 31 juillet 1964 autorisant l'emploi d'enzymes amylolytiques, protéolytiques et pectiques dans les industries de la biscuiterie, des jus de fruits et de légumes et des sirops.

Il convient de noter dans ces textes deux particularités :

1. L'arrêté du 31 juillet 1964 ne mentionne comme source possible des enzymes que le *Bacillus subtilis* ; cependant le Conseil supérieur d'Hygiène publique de France et l'Académie nationale de Médecine n'ont pas soulevé d'objection à l'emploi en alimentation de préparations enzymatiques obtenues à partir d'autres micro-organismes et notamment à partir de certains *Aspergillus* ; une modification de l'arrêté précité est donc envisagée.

2. Ces arrêtés comportent une disposition portant obligation de faire à l'administration responsable (c'est-à-dire au Service de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité) une déclaration préalablement à la fabrication ou à l'importation de préparations enzymatiques destinées aux industries alimentaires. Cette déclaration préalable, à la suite de laquelle l'administration peut présenter des observations quant à la composition, à la présentation ou à la destination ou donner un avis défavorable, est, peut-être, l'une des solutions de souplesse dont la nécessité a été évoquée précédemment.

République Fédérale d'Allemagne.

En Allemagne, la situation semble confuse du fait des dispositions particulières de la loi-cadre sur les aliments qui définit d'une manière très précise non pas les « additifs » aux aliments, mais les « substances étrangères » aux aliments (Fremdstoffe). Il ne semble pas qu'il y ait accord entre les experts allemands eux-mêmes

sur la question du classement des enzymes (ou préparations enzymatiques) : sont-elles, ou non, des « Fremdstoffe » ? La question reste posée. Dans la pratique, en Allemagne, comme presque partout ailleurs, les enzymes (ou préparations enzymatiques) sont employées en alimentation, conformément soit aux dispositions générales concernant les denrées alimentaires, soit aux normes concernant des catégories déterminées d'aliments, ces dispositions ou ces normes pouvant par ailleurs être différentes d'un Land à un autre.

Cependant les pouvoirs publics se préoccupent tout particulièrement d'établir des spécifications, ou normes, ou codes d'usages, relatifs aux préparations enzymatiques destinées à des usages alimentaires.

Il convient de signaler ici que c'est à l'Allemagne que l'on doit le projet de norme relative à de telles préparations et destinée à figurer dans le *Codex alimentarius* international en cours d'élaboration sous la responsabilité de la F. A. O. et de l'O. M. S.

Italie.

En Italie, la situation semble être, à peu de choses près, la même qu'en France, malgré l'existence d'une définition légale des additifs. Les préparations enzymatiques commerciales seraient considérées comme des additifs, dont l'emploi est subordonné à une autorisation préalable. En juin 1972, une réglementation relative aux préparations d'origine bactérienne était en préparation.

Belgique.

De l'exposé des motifs de la loi-cadre belge sur les aliments, loi-cadre qui définit notamment l'additif, il résulte que les préparations enzymatiques sont considérées comme des ingrédients, mais il semble que, dans la pratique, cette assimilation ne concerne que les préparations enzymatiques que l'on pourrait qualifier de traditionnelles, les préparations enzymatiques nouvelles étant assimilées à des additifs dont l'emploi est soumis à approbation ; les pouvoirs publics estiment en effet que l'origine de ces préparations, leur composition, les additifs qu'elles contiennent, le principe même de leur emploi dans la préparation de certains aliments peuvent rencontrer des objections de la part des hygiénistes.

Pays-Bas.

Aux Pays-Bas, les préparations enzymatiques sont nommées, en tant que catégorie, dans la liste des additifs. Il n'y a cependant pas d'interdiction générale de leur emploi, les limitations d'emploi résultant seulement des principes généraux du droit alimentaire néerlandais : innocuité, absence de tromperie, respect des normes relatives à certains aliments, etc.

Royaume-Uni.

Les solutions apportées par le Royaume-Uni aux problèmes de l'emploi des enzymes en alimentation seraient, dans la pratique, sensiblement les mêmes qu'en France, Belgique, Italie ou Allemagne à ceci près, mais la différence est importante, qu'il existe un Comité d'experts des normes alimentaires dont les avis sont portés

à la connaissance du public ; lorsque ces avis sont favorables, ils constituent, en l'absence de décision administrative explicite, une autorisation de fait dont les tribunaux tiennent le plus grand compte.

Situation dans quelques pays en dehors de la C. E. E.

Dans le chapitre précédent, ont été indiquées, d'une manière malheureusement trop sommaire, les caractéristiques essentielles et/ou originales des réglementations des pays de la C. E. E.

Pour leur valeur d'exemples, il peut être utile de donner aussi les caractéristiques des réglementations des pays suivants : U. S. A., Canada, U. R. S. S. et Suède.

U. S. A.

En ce qui concerne les additifs, deux systèmes de réglementation coexistent aux États-Unis : le système dit G. R. A. S., dont bénéficient les substances « généralement reconnues comme sans danger » (Generally recognized as safe) qui sont utilisables suivant les règles de bonnes pratiques de fabrication ou selon les règles propres à une catégorie déterminée d'aliments, et le système des additifs proprement dits auquel le principe des listes positives, assorti de conditions déterminées d'emploi, est applicable.

Pour les besoins du *Codex alimentarius*, il a été procédé aux U. S. A. à un relevé des préparations enzymatiques utilisées en fait par les industries alimentaires ; ces préparations, d'origine animale, végétale ou microbienne (bactérienne ou fongique) sont au nombre de 46.

La moitié d'entre elles bénéficient du statut G. R. A. S., certaines autres sont considérées tantôt comme « G. R. A. S. », tantôt comme véritables additifs suivant l'usage qui en est fait (clarifiant par exemple, ou additif destiné à rester présent dans le produit fini).

La réglementation américaine semble donc bien refléter les incertitudes actuelles en ce qui concerne le statut à donner aux préparations enzymatiques pour usages alimentaires.

Canada.

Au Canada, il existe une réglementation particulière, et cohérente, relative aux préparations enzymatiques à usage alimentaire. Ces préparations sont des additifs soumis au statut des listes positives assorties des conditions d'emploi. Les préparations enzymatiques autorisées sont au nombre de 16.

U. R. S. S.

En U. R. S. S., la situation semble être aussi claire qu'au Canada. Les préparations enzymatiques sont considérées comme des additifs et l'emploi des additifs est régi par le principe dit des listes positives. Dans ces listes, les préparations enzymatiques sont classées comme « agents améliorants », c'est-à-dire comme substances utilisées pour des raisons d'ordre technologique.

Sont autorisés 7 types d'enzymes ou de préparations enzymatiques, l'une d'ori-

gine végétale (ficine), les 6 autres d'origine fongique. Ces préparations servent au traitement du pain, de la bière ou des harengs salés ; les concentrations autorisées sont indiquées.

Suède.

En Suède aussi, les enzymes et les préparations enzymatiques sont considérées comme des additifs et soumises comme elles aux dispositions appropriées de la loi-cadre sur les aliments. L'originalité, en Suède, consiste dans le fait que la liste positive des additifs dont l'emploi est autorisé est mise à jour d'une manière périodique (une fois par an).

Les préparations enzymatiques figurent dans cette liste, en tant que catégorie, sans qu'il soit fait mention des différents types d'enzymes. Elles ne peuvent être employées que pour les aliments qui ne font pas l'objet de normes spécifiques.

CONCLUSION

Il semble que la plupart des pays ont éprouvé des difficultés à établir une réglementation des préparations enzymatiques pouvant être employées en alimentation qui soit parfaitement adaptée aux besoins quelquefois contradictoires de la protection de la santé publique, de la protection du consommateur, du maintien ou de l'amélioration de la qualité des aliments, du développement des industries alimentaires, parfaitement adaptée aussi aux nécessités d'un contrôle efficace et de nature à ne pas constituer un frein à un progrès bien compris.

A une époque où la production des aliments revêt souvent un caractère multinational, des solutions au problème de la réglementation des préparations enzymatiques sont également recherchées au plan international et notamment dans le cadre de la Communauté économique européenne et dans le cadre du *Codex alimentarius*.

SUMMARY

USE OF ENZYMES IN E. E. C. COUNTRIES

Until these last decades the use of enzymes in food stuffs was governed either by the so-called rules « of good manufacture methods », which were transmitted through tradition and possibly defined in professional codes, or by prescribed standards defining different classes of foodstuffs or drinks.

The recent and very rapid growth of the production of enzymatic preparations the development of researches in food industry, especially in the promising field of the use of enzyme original properties, brought some changes, and require the working out of a specific regulation.

The governments of all Common Market countries are well aware of this need ; however the few promulgated rules in relation to this subject provide but a partial solution. The guide lines of a more complete solution could be as follows : commercial enzymatic preparations are considered as additives ; thier identification and purity criteria, their use and labelling conditions must be defined.

ZUSAMMENFASSUNG

GEZETZGEBUNG BETREFFS ANWENDUNG VON ENZYMEN IN DEN LÄNDERN DER EUROPÄISCHEN WIRTSCHAFTSGEMEINSCHAFT. PRINZIP DER GEMEINSCHAFTLICHEN GESETZGEBUNG

Bis auf die letzten Jahre wurde die Verwendung von Enzymen entweder nach den guten Herstellungsverfahren geregelt, die durch Tradition und eventuell durch Anwendungsverfahren definiert wurden, oder durch gesetzliche. Normen, die gewisse Kategorien von Nahrungsmitteln oder Getränken charakterisierten. Die ausserordentlich schnelle Entwicklung, die die Produktion von enzymatischen Präparaten in der jüngsten Zeit erfahren hat und die Entwicklung der Forschung in der Nahrungsmittelindustrie insbesondere in bezug auf die auf ihre spezifischen Eigenschaften beruhenden vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Enzyme, haben die Situation massgebend verändert und machen die Ausarbeitung einer spezifischen gesetzlichen Regelung notwendig.

In allen Ländern das gemeinsamen Marktes ist man sich durchaus dieser Notwendigkeit bewusst, jedoch ist die augenblicklich bestehende Regulierung nur eine teilweise Lösung. Die Hauptprinzipien einer vollständigeren Lösung sind folgende : Die kommerziellen Enzym präparate werden als Zusatzstoffe betrachtet. Ihre Identitätskriterien, ihre Reinheit und Anwendungsbedingungen sowie Kenntlichmachungsvorschriften müssen definiert werden.

CONCLUSIONS

Permettez-moi d'abord de remercier M. Salmon-Legagneur, secrétaire scientifique du Comité Technologie alimentaire et agricole de la D. G. R. S. T. et M. Cognard, secrétaire générale de l'Union de la Biscuiterie-Biscotterie et Produits de Régime, pour les paroles aimables qu'ils ont eues à mon égard en ouvrant ce symposium.

En fait, ma mission de coordination a été simple et facilitée en raison de l'habitude de la plupart d'entre nous de prendre part aux travaux du Centre national d'Études et de Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation, sous la houlette du Pr Terroine.

Grâce à la bonne volonté de chacun, ce travail en équipe s'est déroulé dans un climat de sympathie et de confiance.

Dans ce cadre, utilisateurs et producteurs ont pu avoir des contacts et des discussions autres que celles d'acheteurs à vendeurs.

Je voudrais remercier la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique, grâce à laquelle ce travail concerté, faisant intervenir une grande partie des laboratoires français s'intéressant aux céréales, a pu être effectué.

Au cours de ces deux journées, nous avons pu faire un large tour d'horizon sur les industries de cuisson à base de céréales. Il n'était pas inutile d'attirer à nouveau l'attention sur le rôle primordial et multiple, mais encore mal connu, que jouent les enzymes dans les processus de transformation intervenant dans ces industries, sans doute les premières à avoir utilisé, avec le malt, l'addition de préparations enzymatiques.

Ces industries ont certes des points communs, mais, aussi, bien des différences. Panification, biscotterie et biscuiterie demandent des matières premières de caractéristiques presque opposées. Même en panification, selon les pays, selon les types de produits, les problèmes posés sont très différents. C'est ainsi que les procédés de panification peuvent mettre en œuvre :

— un développement des pâtes, soit mécanique, soit chimique, soit biologique et biochimique, soit mixte ;
— des modes de cuisson très différents ;
— des durées de panification pouvant varier de moins d'une heure à plus de 7 heures.

On conçoit ainsi qu'il ne soit guère possible de transposer d'un pays à l'autre les résultats des travaux sur l'emploi des enzymes dans les industries de cuisson. Les différences observées à la suite de leur utilisation proviennent, soit des matières premières, c'est-à-dire de l'état des substrats et de leur concentration, soit des modes de panification, c'est-à-dire des conditions d'action des enzymes, soit enfin des pro-

duits finis, c'est-à-dire des substances formées au cours des réactions enzymatiques.

L'ensemble de ces remarques suffit à justifier cette action concertée, si besoin en était.

Peut-on dire qu'au terme de celle-ci nous ayions atteint les buts fixés ?

Je crois que, sur le plan des contacts humains et de la collaboration confiante, on peut répondre oui sans hésiter. Sur le plan des connaissances théoriques ou pratiques sur l'emploi des enzymes, la réponse est également positive mais reste plus nuancée du fait qu'un tel programme n'est jamais terminé.

Pour ce qui concerne les amylases, nos connaissances au départ étaient assez avancées. Les travaux réalisés doivent permettre un emploi plus judicieux des différentes alpha-amylases qui, on l'a vu, ne sont pas interchangeables. On peut par ailleurs espérer avoir un mode de dosage pratique de l'activité des différentes amylases dans un mélange, au moins pour les cas simples. De plus, l'intérêt de la glucamylase a pu être mis en évidence, ce qui laisse prévoir d'autres applications et on peut penser que de nouvelles enzymes (enzymes déramifiantes par exemple) pourront aussi trouver des utilisations dans nos industries, si elles atteignent un prix compétitif. Par contre, la recherche d'inhibiteurs « alimentaires » de l'alpha-amylase des blés germés n'a pas encore abouti à des solutions satisfaisantes.

Pour les protéases, le tableau que l'on peut dresser est un peu moins réjouissant pour le praticien ; contrairement au cas précédent, substrats et enzymes sont moins bien connus. Ce n'est que récemment qu'il a été montré qu'une grande partie de l'activité protéolytique des farines n'est pas du type papaïne, contrairement aux idées qui ont prévalu pendant plus de 30 ans ; on suppose même que certaines protéases de blé pourraient être d'origine microbienne.

Actuellement, le problème se situe encore au niveau du mode de dosage des différentes activités et des corrélations que l'on peut avoir entre les résultats et les effets recherchés en pratique.

Cependant, l'intérêt de ces protéases pour la biscuiterie et les produits diététiques a pu être souligné, de même que les possibilités offertes par l'alvéographe Chopin pour apprécier l'influence de ces enzymes dans les pâtes.

Pour ce qui est des lipases et surtout des lipoxygénases les travaux réalisés ont eu des répercussions à la fois sur le plan théorique et pratique.

A partir du moment où l'on a pu isoler, purifier et même cristalliser ces enzymes, mieux les connaître en milieu modèle, mieux démonter leur mécanisme, les problèmes ont commencé à s'éclaircir. La lipase prépare le travail de la lipoxygénase en lui fournissant ses substrats. Cette lipoxygénase semble se trouver à un véritable carrefour dans les processus d'évolution des pâtes et, en fait, tout ceci a été révélé par un changement d'intensité dans le pétrissage ; en éliminant ainsi le facteur limitant (contact enzymes-substrat et oxygène), on obtient d'un coup la peroxydation des acides gras essentiels, l'oxydation des pigments caroténoïdes, des vitamines E et des complexes protidiques, par des voies pas toujours bien connues. Le résultat est à la fois bénéfique et néfaste ; si tout n'est pas encore complètement explicité, nous tenons un certain nombre de fils conducteurs et on a l'impression de savoir maintenant par quel bout prendre le problème pour maîtriser les phénomènes apparemment contradictoires. Dans un sens, le travail est pour l'instant plus positif sur le plan fondamental que pratique et c'est bien normal ; la compréhension des mécanismes permet de mieux maîtriser les applications.

Je souhaiterais que nos amis industriels français ne soient pas les derniers à profiter des divers résultats acquis et qu'une collaboration étroite se maintienne entre chercheurs des secteurs public et privé pour aider à la mise au point des applications possibles, en facilitant les choses sur le plan législatif.

Les travaux d'ordre fondamental, orienté ou pratique, nous ont mis en bonne position au niveau international. On reproche parfois aux chercheurs français de se complaire dans la théorie, mais celle-ci est indispensable pour bien maîtriser les mécanismes. Il convient ensuite de ne pas laisser aux autres le soin d'en tirer profit. La structure de recherche mise en place nous semble bien adaptée à cette fin, si on lui fournit les moyens nécessaires.

Le problème, pour nos amis producteurs d'enzymes, est de trouver de nombreux débouchés. On peut penser d'une part que ceux-ci peuvent être recherchés non seulement en France, mais aussi dans les pays voisins, et d'autre part que les applications possibles ne se limitent pas au secteur des industries de cuisson à base de céréales. Les études réalisées dépassent largement le cadre de nos industries. L'action des amylases et protéases a des répercussions importantes dans nombreux autres domaines en malterie-brasserie, pour ne citer qu'un exemple ; il en est de même pour celle de la lipoxygénase si l'on pense à l'emploi possible de fèveroles en alimentation animale.

Par ailleurs, d'autres enzymes demanderaient à être étudiées pour nos industries : pentosanasses, hémicellulases, pectinases et autres systèmes oxydasiques (polyphénoloxydase et peroxydase, par exemple).

Il est certain que l'emploi des enzymes est particulièrement séduisant comparé à l'emploi des produits chimiques ; ils ont l'intérêt :

— d'être des constituants naturels des produits biologiques ;
— d'avoir une action plus ménagée, plus spécifique et d'être plus thermolabiles.

Mais, en fait, ce qui compte ce sont les produits résultant de la réaction ou des réactions secondaires et tout spécialement en ce qui concerne l'oxydation des constituants hydrophobes des farines et des pâtes.

On peut se poser la question, à la limite, de savoir quel processus il convient de préférer : ou bien l'emploi d'acide ascorbique conduisant à la formation d'eau oxygénée, ou bien celui de lipoxygénase conduisant à la formation d'hydroperoxydes instables, ou bien encore, l'utilisation d'oxydants chimiques tels que le bioxyde de chlore, par exemple. En fait, tous ces produits provoquent des oxydations qui aboutissent à des composés dont on ne connaît pas toujours complètement la nature ni les caractéristiques, et il y a là matière à réflexion. Quoiqu'il en soit, pour revenir à l'emploi des enzymes, il est indéniable qu'il y a intérêt à mieux connaître les caractéristiques des préparations enzymatiques pouvant être utilisées : leur état de pureté, les caractéristiques de la protéine enzymatique, leurs température et pH optimaux d'action ainsi que les autres effecteurs de la réaction. Il convient également, autant que faire se peut, d'avoir des préparations ne présentant qu'un seul type d'activité ; faut-il rappeler à ce sujet que des chercheurs américains ont découvert l'intérêt d'une activité protéolytique en panification de produits riches en gluten, tant les soit-disant amylases fongiques étaient riches en protéases. De plus, il reste encore beaucoup de travaux à réaliser dans les domaines :

— de la normalisation de l'activité des préparations, des points de vue modes de dosage et d'expression ;

— de la conservation de l'activité, afin de tendre vers une facilité et une sécurité maximales au niveau du moulin ou des industries de deuxième transformation ;
— et enfin, du contrôle sur le plan de l'hygiène et de l'innocuité pour le consommateur.

Cependant, il ne faut pas exagérer des difficultés qui peuvent être résolues et qui ne devraient pas gêner l'emploi des enzymes dans nos industries.

En ce qui concerne les problèmes posés par le goût du pain et de son acceptabilité par le consommateur, il est bien certain qu'ils sont forts complexes, comme l'a souligné M. GUINET, les motivations du consommateur pouvant apparaître en effet très variées et souvent contradictoires. Par ailleurs, avec l'ouverture du marché commun avec des pays où l'industrialisation de la panification est déjà très avancée, il convient de maintenir les caractéristiques originales qui ont fait la réputation du pain français sans pour autant négliger les techniques modernes et la diversification des autres produits de cuisson.

Tels sont les points que je souhaitais souligner pour terminer et je pense qu'il serait bon de voir dans quelle mesure il n'y a pas là matière à la mise en place d'une nouvelle action concertée, faisant intervenir des nutritionnistes et toxicologues pour bien préciser les spécifications des enzymes utilisées en industrie alimentaire.

A. GUILBOT

annales de technologie agricole

Trimestriel

1974

Vol. 23 . N° 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 403-410.

L'IONOMÉTRIE. DOSAGE DU CALCIUM DANS LES VINS

A. CASANOVA
avec la collaboration technique de L. MORA

Laboratoire de Chimie et de Technologie,
École nationale d'Ingénieurs des Travaux agricoles de Bordeaux,
1, cours Général de Gaulle,
33170 Gradignan

RÉSUMÉ

L'emploi d'une électrode spécifique échangeuse d'ions calcium a permis de mettre au point une méthode de dosage de cet ion dans les vins. Les résultats sont en bon accord avec ceux obtenus par les autres méthodes (précipitation à l'oxalate et titrage manganimétrique, dosage complexométrique, spectrométrie d'absorption atomique).

Mots clés : *ionométrie, calcium, vin.*

I. — INTRODUCTION

Depuis 1966 ont été créés de nouveaux types d'électrodes spécifiques à membrane cristalline, liquide ou hétérogène, qui ont permis d'élargir la gamme des ions minéraux ou organiques dosables par potentiométrie. La variation de potentiel est due uniquement à la variation de l'activité de l'ion calcium de l'échantillon. L'électrode spécifique suit la loi de Nernst dans le domaine d'activité en ions calcium compris entre 10^{-1} et 10^{-4}M. Certains cations bivalents, tels que Zn^{++}, Fe^{++}, Pb^{++}, Cu^{++} peuvent influer sur les mesures. Mais l'électrode est surtout sensible aux ions hydrogène. Lorsque le pH est inférieur à 4, l'électrode est fortement influencée par les ions H^+.

Cependant, le potentiel d'électrode suit de façon assez satisfaisante l'équation de NICKOKSKY (1937) qui dans ce cas a pour expression :

$$E = E''^{0} + \frac{RT}{2F} \log \left(a_{Ca^{++}} + K_{Ca^{++}/H^{+}} \cdot a^{2}{}_{H^{+}}\right)$$

$K_{Ca^{++}/H^{+}}$ est de l'ordre de 10^{5}. A partir de pH 5,5, l'interférence devient négligeable. Il est préférable, pour effectuer les mesures, de ramener les solutions dans la zone de pH comprise entre 6,5 et 7. La théorie de ces électrodes a été exposée par DURST (1969) suivie d'une mise au point par GAVACH (1971).

II. — DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL. TECHNIQUES DE MESURES

A. — *Dispositif expérimental*

1. *Réalisation de la pile.*

L'électrode spécifique utilisée est celle de la firme Orion n° 92 20. Elle est fixée à un support, son corps incliné de 20° par rapport à la verticale, ceci afin d'éviter la formation de bulles d'air au niveau de la membrane.

L'électrode de référence est une électrode au calomel. Toutes deux plongent dans la solution à analyser.

2. *Mesure du potentiel.*

L'appareil de mesure utilisé est un millivoltmètre, type Radiometer modèle PHM4, d'impédance d'entrée élevée (10^{12} Ω), fonctionnant suivant le principe d'opposition.

Il est nécessaire d'isoler le système électrodes-solution des influences électrostatiques. Ceci est réalisé en utilisant une cage de Faraday.

3. *Influence de la température.*

En toute rigueur, la cage de Faraday doit être thermostatée pour opérer dans des conditions standards. Pour notre part, nous avons travaillé à la température du laboratoire.

4. *Produits utilisés.*

Toutes les solutions ont été préparées au moment de l'emploi. Tous les produits sont RP.

B. — *Techniques de mesures*

1. *Potentiométrie directe.*

Pour déterminer l'activité de l'espèce ionique pour laquelle cette électrode est spécifique, on constitue la chaîne suivante :

électrode de référence	jonction saline	solution contenant l'ion *i*	électrode spécifique de l'ion *i*

La différence de potentiel aux bornes d'appareil de mesure, E_{cell}, est égale à la somme algébrique des différences de potentiel de la chaîne :

$$E_{cell} = E_{spé} - E_{réf} + E_{jn}$$

$E_{spé}$: potentiel de l'électrode spécifique ;
$E_{réf}$: potentiel de l'électrode de référence ;
E_{jn} : potentiel de jonction.

D'après la loi de Nernst, on en déduit l'activité de l'ion i :

$$a_i = \exp \frac{ZiF}{RT} (E_{cell} - E^{0''}{}_{spé} + E_{réf} - E_{jn}).$$

On mesure les différences de potentiel d'une série de solutions de concentration variable en ion i afin de tracer un abaque.

Ces valeurs sont portées sur papier semi-logarithmique. On obtient, en ce qui concerne les activités, une droite ayant une pente théorique (pour le calcium, à 25°C, la variation de potentiel enregistrée est de 29,58 mV chaque fois que l'activité des ions calcium est multipliée par 10). Les concentrations sont obtenues par la relation $a = \gamma c$ (γ = coefficient d'activité déterminé à partir de la force ionique totale).

2. *Méthodes potentiométriques par addition.*

Elles permettent de déterminer la concentration totale d'une espèce ionique. Elles consistent à ajouter des doses connues de l'ion mesuré dans l'échantillon initial à partir de la variation observée du potentiel d'électrode. Ces méthodes sont utilisées particulièrement lors de mesures de la concentration dans des échantillons contenant de grands excès d'agents complexants, ou présentant des variations de force ionique. Il n'est pas alors nécessaire de tracer la courbe d'étalonnage. Toutefois, il faut s'assurer que la pente théorique de Nernst a été vérifiée précédemment à l'électrode.

a) *Méthode de l'incrément connu.*

Avant addition de solution standard, la différence de potentiel mesurée a pour expression :

$$E_1 = E''^0 + \frac{RT}{2F} \text{Log} (C_x \cdot \gamma_x \cdot f) + Ejn$$

C_x : concentration initiale totale ;
γ_x : coefficient d'activité de l'ion ;
f : fraction ionisée.

Après addition, la variation de potentiel ΔE est reliée à la variation de concentration ΔC_x de l'ion :

$$E_1 + \Delta E = E''^0 + \frac{RT}{2F} \text{Log} [(C_x + \Delta C_x) \gamma_x \cdot f] + Ejn.$$

L'addition de solution standard doit être telle que γ_x demeure constant, donc que la force ionique totale de l'échantillon ne soit pas modifiée. D'autre part f, fraction ionisée de la quantité totale d'ions, doit demeurer également constante, ce qui est le cas si les agents complexants sont présents en grand excès par rapport à la concentration totale de l'ion considéré. Dans ce cas, en faisant la différence des équations ci-dessus, on obtient une valeur ΔE indépendante de E''^0, Ejn, de γ_x et de f :

$$\Delta E = \frac{RT}{2F} \text{Log} \left(\frac{C_x + \Delta C_x}{C_x} \right).$$

Si l'on pose : $S = RT/2F$, on tire :

$$C_x = \Delta C_x \exp \left[\left(\frac{\Delta E}{S} \right) - 1 \right]^{-1}.$$

Si l'on désigne par Vst et Cst le volume et la concentration de la solution standard ajoutée, et V_x le volume de l'échantillon, on déduit de la relation précédente :

$$C_x = Cst \frac{Vst}{V_{st} + V_x} \text{Exp} \left[\left(\frac{\Delta E}{S} \right) - \frac{Vx}{V_{st} + V_x} \right]^{-1}.$$

La précision de la méthode sera optimale lorsque l'addition de solution standard provoquera une grande variation de potentiel sans modifier la force ionique du milieu.

Toutefois, ce problème peut être évité en ajoutant à l'échantillon une grande quantité de sel non interférant pour amener la force ionique à un point tel que l'addition d'une petite quantité de l'ion analysé ne modifie pas γ.

b) *Méthode du double ajout.*

Elle peut être utilisée dans les régions de concentration où la réponse de l'électrode ne suit pas la loi de Nernst, et où les interférences sont appréciables, sans connaissance précédente de comportement de l'électrode dans les échantillons. Il faut cependant que la concentration des ajouts soit suffisamment petite pour considérer la pente de la droite comme constante, et la variation de la force ionique faible. En cas de présence d'agents complexants, la fraction d'ions complexés doit rester constante.

Les variations de volume dues aux ajouts doivent être négligées. Dans ces conditions, on a :

$$E_1 = E'^0 + S \text{ Log } (\gamma \cdot f \cdot C_s)$$

γ : coefficient d'activité ;
f : fraction libre de l'ion ;
C_s : concentration totale de l'ion.

A la suite du premier ajout, si C_a est la variation de concentration de l'échantillon, la différence de potentiel mesurée devient :

$$E_2 = E'^0 + S \text{ Log } \gamma \cdot f (C_s + C_a)$$

et après le deuxième ajout :

$$E_3 = E'^0 + S \text{ Log } \gamma \cdot f (C_s + 2\ C_a).$$

De ces trois égalités, on tire :

$$\Delta E_2 = E_2 - E_1 = S \text{ Log } \left(\frac{C_s + C_a}{C_s}\right)$$

$$\Delta E_3 = E_3 - E_1 = S \text{ Log } \left(\frac{C_s + 2\ C_a}{C_s}\right).$$

On détermine le rapport $\frac{\Delta E^3}{\Delta E^2}$ soit :

$$\frac{\Delta E_3}{\Delta E_2} = R = \text{Log } \frac{\frac{C_s + 2\ C_a}{C_s}}{\frac{C_s + C_a}{C_s}}$$

A partir de la table éditée par Orion (1970), on obtient la valeur du rapport C_s/C_a en fonction de celle de R, et donc finalement la valeur de la concentration totale par simple calcul.

3. *Conditions de force ionique.*

a) La force ionique de l'échantillon doit demeurer constante. Les meilleurs résultats sont obtenus quand elle a une valeur voisine de celle de la solution interne de référence.

b) La solution standard doit avoir une concentration telle que les ajouts modifient peu la force ionique de l'échantillon et que les différences de potentiel enregistrées soient suffisamment grandes pour éviter les incertitudes faites sur les mesures.

c) Les expériences doivent se dérouler à la même température afin que le facteur RT/2F reste constant.

4. *Établissement des conditions optimales.*

La première condition est remplie lorsque le milieu a une teneur en magnésium de $1{,}6 \cdot 10^{-2}$ M (cet élément a un faible coefficient de sélectivité par rapport au calcium (0,014)) à un échantillon dont la concentration en calcium est de 10^{-3} M. La force ionique du milieu est alors $5 \cdot 10^{-2}$ M.

La deuxième condition est réalisée si la concentration de la solution des ajouts est de $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ M.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

A. — *Détermination de la concentration du calcium en solution pure par la méthode potentiométrique du double ajout*

La solution initiale contient 40 mg par litre de calcium. On effectue trois additions successives de 1 ml de solution de calcium $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ molaire, et l'on note la différence de potentiel obtenue après chaque addition. Les résultats (tabl. 1), confirmés à plusieurs reprises, montrent une concordance satisfaisante. En effet, l'écart maximum constaté à la valeur réelle est de 2 p. 100.

TABLEAU I

Différences de potentiel lues et concentrations calculées après trois additions successives de 1 ml de solution de calcium $2{,}5 \cdot 10^{-2}$ molaire à une solution initiale contenant 40 mg/l de calcium

N° de l'échantillon	1er ajout		2e ajout		3e ajout	
	ΔE (mV)	$C_x \cdot 10^{-3}$	ΔE (mV)	$C_x \cdot 10^{-3}$	ΔE (mV)	$C_x \cdot 10^{-3}$
1	10,3	1,011	19,9	1,006	27,4	1,000
2	10	1,057	19,7	1,025	27,2	1,018
3	10,3	1,011	19,8	1,015	27,2	1,018
4	10,3	1,011	19,5	1,046	27	1,021
C_x en M/l	$1{,}023 \cdot 10^{-3}$		$1{,}023 \cdot 10^{-3}$		$1{,}019 \cdot 10^{-3}$	
en mg/l	40,9		40,9		40,75	

B. — *Détermination du calcium dans le vin par la méthode employée ci-dessus*

Technique opératoire.

Par évaporation et calcination du vin, on supprime les substances qui interfèrent et polluent l'électrode. Les cendres obtenues à partir de 25 ml de vin sont solubilisées par l'acide chlorhydrique concentré, le volume de l'échantillon étant ensuite ramené à 50 ml par l'eau distillée pour avoir un volume suffisant. Cette solution acide est amenée à pH 6,5-7 au moyen d'ammoniaque. La méthode du double ajout appliquée à 10 échantillons d'un même vin a donné les résultats reportés dans le tableau 2.

Nous avons éprouvé la reproductibilité de la méthode par l'analyse statistique. A partir de la moyenne des résultats, nous avons calculé les écarts et la somme des carrés des écarts à la moyenne. Le degré de liberté étant de 9, on obtient un écart type $\sigma = 4{,}02$. L'intervalle de reproductibilité calculé pour un degré de confiance de 95 p. 100 à partir du coefficient de Student est de 2,87. Au risque 5 p. 100, on peut

TABLEAU 2

Résultats obtenus par la méthode du double ajout sur 10 prises d'essai d'un même vin

(Les additions sont réalisées dans les mêmes conditions qu'au paragraphe A)

Prises d'essai n°	ΔE_2 (mV)	ΔE_3 (mV)	C_x calculé en mg/l
1	21,1	27,1	2,24 10^{-3}M = 89,60
2	23,5	30	2,10 10^{-3}M = 84,00
3	21,5	27,5	2,10 10^{-3}M = 84,00
4	24	30,5	1,897 10^{-3}M = 75,88
5	23	29,5	2,218 10^{-3}M = 88,72
6	23,5	30	2,134 10^{-3}M = 85,36
7	24	30,5	2,00 10^{-3}M = 80,00
8	23	29,3	2,075 10^{-3}M = 83,00
9	23	29,3	2,050 8 10^{-3}M = 82,03
10	21,2	27	2,035 10^{-3}M = 81,40

TABLEAU 3

Résultats comparatifs entre les différentes méthodes utilisées pour doser le calcium dans le vin

Méthodes	Valeurs trouvées (en mg/l)	Intervalles de confiance (en mg/l)
Précipitation à l'oxalate des cendres et dosage manganimétrique	83	80 < 83 < 85
Complexométrie sur cendres (EDTA)	79	73 < 79 < 85
Absorption atomique sur vin dilué	84	79 < 84 < 89
Potentiométrie sur cendres	83,3	80,5 < 83,3 < 86,3

donc affirmer que la teneur en calcium total du vin analysé est comprise entre 80,5 et 86,3 mg/l.

Les intervalles de confiance des autres méthodes (tabl. 3) sont du même ordre au risque 5 p. 100.

IV. — CONCLUSION

Les résultats obtenus par l'électrode spécifique au calcium pour le dosage de cet ion dans le vin permettent de conclure que cette nouvelle technique analytique, dans des conditions bien définies, donne entière satisfaction. La reproductibilité et la précision des mesures suppriment certaines étapes fastidieuses des dosages par précipitation ou par complexion, elles évitent le matériel lourd et onéreux qu'exige l'absorption atomique.

Reçu pour publication en mai 1974.

SUMMARY

IONOMETRY.
THE DETERMINATION OF THE CALCIUM CONTENT IN WINES

A calcium selective electrode has been used to determine the calcium ion content in wines. The potentiometric method of double known addition, under some conditions, gives results which are in good agreement with those obtained by others methods as oxalate precipitate on ashes and manganimetric titration, complexometric admixure on ashes by EDTA, atomic absorption spectrophotometry.

RESUMEN

LA IONOMETRIA. POSIBILIDADES DE APLICACION PARA LA DOSIFICACION DEL CALCIO EN LOS VINOS

El empleo de un electrodo específico intercambiador de iones de calcio, ha permitido poner a punto un método de dosificación de este ión en los vinos. Los resultados están en correcta concordancia con los obtenidos por otros métodos (precipitación al oxalato y titulación manganimétrica, dosificatión complexométrica, espectrometría de absorción atómica).

RIASSUNTO

L'IONOMETRIA. LE SUE POSSIBILITA' D'APPLICAZIONE AL DOSAGGIO DEL CALCIO NEI VINI

L'impiego di un elettrodo specifico scambiatore di ioni di calcio ha permesso di mettere a punto un metodo di dosaggio di questo ione nei vini. I risultati concordano con quelli ottenuti con altri metodi (precipitazione all'ossalato e titolazione manganimetrico, dosaggio complessometrico, spettrometria d'assorbimento atomico).

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

DURST R., 1969. Ion selective electrodes. *National Bureau of Standards*, Washington.
GAVACH C., 1971. Les nouvelles électrodes à membrane. *Bull. Soc. chim.*, **9**, 3395-3407.
NICKOLSKY B. P., 1937. *Acta physiochim.*, U. R. S. S., **7**, 597.
ORION research incorporated, 1970. Theory of double known addition. *Newletters*, **2** (7 et 8).

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 411-420.

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION INITIALE DE L'ACIDE MALIQUE DES MOÛTS SUR LE DÉCLENCHEMENT ET L'ÉVOLUTION DE LA FERMENTATION MALO-LACTIQUE

P. BRÉCHOT, J. CHAUVET* et Madeleine CROSON

Laboratoire des Fermentations de l'Institut Pasteur,
75015 Paris

* *Cuvage Chauvet Frères et Cie,*
La Chapelle-de-Guinchay
71570 La Chapelle Pontanevaux

RÉSUMÉ

Les observations consignées dans cette étude conduisent à mettre en évidence le rôle de la concentration initiale de l'acide malique des moûts du Beaujolais pour déclencher la fermentation malo-lactique.

Le rôle de l'acide malique dans la régulation de la glycolyse hétérolactique est suggéré.

Mots clés : *acide malique, fermentation malo-lactique.*

INTRODUCTION

Dans un travail antérieur nous avons montré la part des raisins, des levures et des bactéries dans la disparition de l'acide malique (Bréchot *et al.*, 1969). Au cours d'une étude de certains facteurs déterminants de la fermentation bactérienne malo-lactique, la concentration initiale de l'acide malique des moûts a retenu notre attention ; les observations que nous avons pu faire à ce sujet au cours des cinq années 1969-1973, en liaison avec certains aspects des vinifications, font l'objet de la présente communication. Ces observations se limitent au vignoble beaujolais complanté uniquement en cépage *Gamay*.

TECHNIQUES UTILISÉES

Deux méthodes de vinification, la méthode beaujolaise traditionnelle (TRAD) et sa variante la macération carbonique (MC), ont été utilisées ; celles-ci ont été décrites ailleurs (Bréchot et Chauvet, 1971).

La chaptalisation a été pratiquée en 1969, 1970, 1972, lorsque les richesses glucidiques des moûts étaient insuffisantes; elle a toujours eu lieu après le pressurage dans les limites légales de la législation, conduisant à des augmentations de titre alcoolique inférieures ou égales à 2° GL et des teneurs alcooliques finales inférieures ou égales à 13° GL.

Les déterminations de l'acide *l*-malique, des acides L(+) et D(—) lactiques, ont été faites à l'aide des enzymes du commerce (Boerhinger) :

MDH (cœur de porc), n° 15 048 du catalogue.
LDH L(+) (cœur de porc), n° 15 372 du catalogue.
LDH D(−) (*Lactobac. leischmanii*), n° 15 002 du catalogue

suivant les techniques de Peynaud et Blouin (1965, 1966) et Hohorst (1970).

Densité, richesse en sucre réducteur (Fehling), acidités totale et volatile ont été déterminées par les techniques analytiques œnologiques usuelles.

Au cours de notre étude, il a été tenu compte de certaines caractéristiques météorologiques relevées par la station météorologique des Bruyères à Charnay-les-Mâcon.

Enfin, nous signalons que toutes ces vinifications ont été conduites en absence de sulfitage ; ce n'est qu'en fin de vinification, fermentations alcoolique et malo-lactique achevées, dans le cas de vins cassants, qu'un sulfitage (SO_2 + acide ascorbique) a été mis en œuvre.

De plus, une stricte hygiène préventive a toujours été observée ; après chaque apport de vendange, les bennes-comportes étaient lavées à l'eau claire; de même, après chaque cuvée, les cuves, pressoir, pompes, tuyaux d'évacuation. En fin de journée, le sol cimenté du cuvage était également lavé et toute trace de moût ou de vin sur les cuves était éliminée par épongeage.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont consignés dans les différents tableaux.

Le tableau 1 représente les positions respectives des deux fermentations alcoolique (FA) et malo-lactique (FML), compte tenu des jours de cuvaison et des années de campagne.

Les jours de cuvaison ont été uniformément ramenés à quinze jours ; nous considérons que la cuvaison est terminée lorsque les deux fermentations alcoolique et malo-lactique sont achevées.

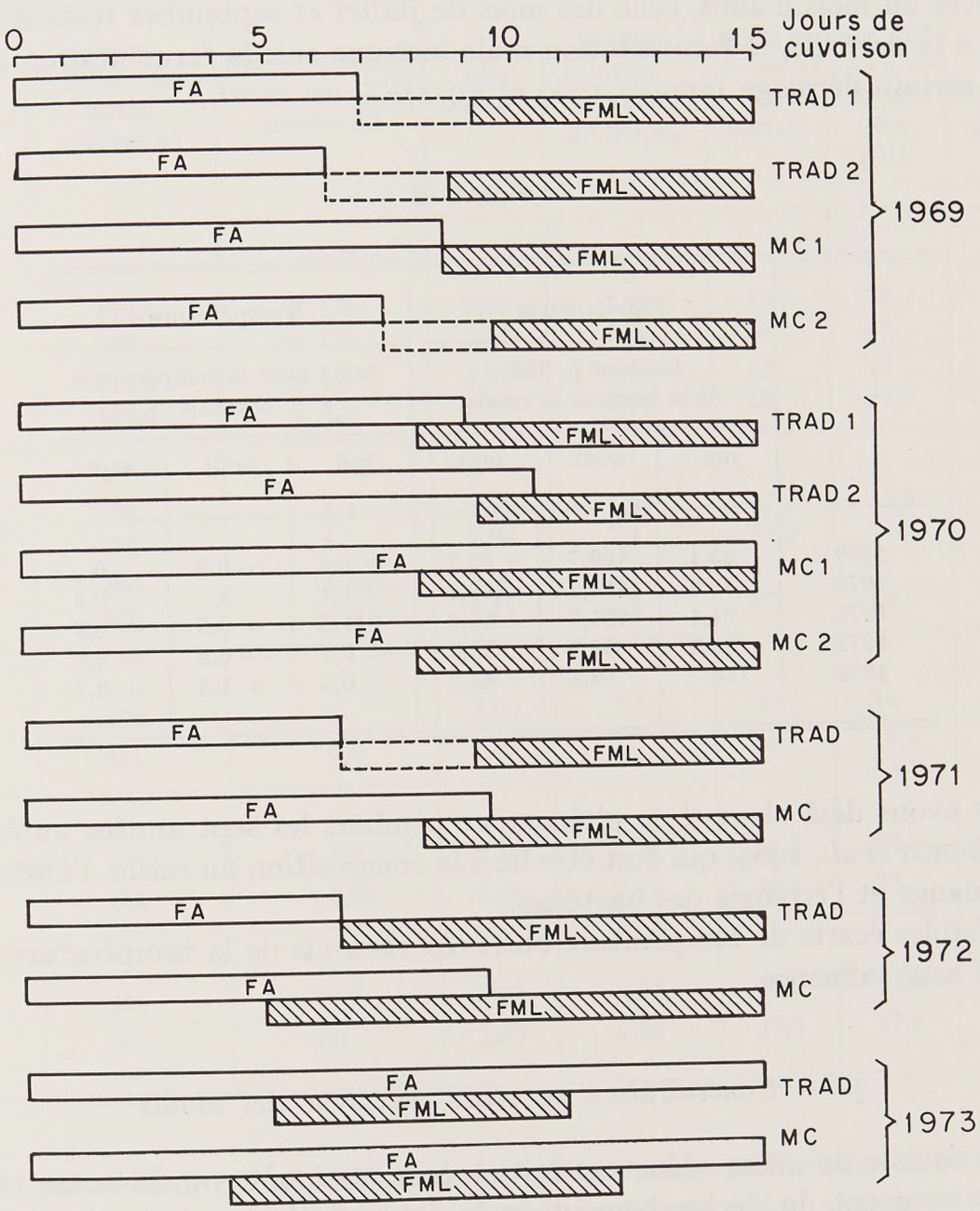
Les rectangles correspondant à chaque fermentation, clairs pour la fermentation alcoolique, hachurés pour la fermentation malo-lactique, ont des longueurs proportionnelles à leur durée en jours, corrigées par la durée de cuvaison standard choisie ; l'emplacement respectif de deux fermentations est basé sur leur jour d'apparition et d'achèvement dans ce système de représentation.

Ce graphique montre que la dégradation malique bactérienne, selon une donnée classique, suit la fermentation alcoolique (années : 1969 (TRAD et MC), 1971 et 1972 (TRAD)), ou bien se fait en même temps que la fermentation alcoolique ; dans ce dernier cas on constate deux alternatives :

a) la fermentation malo-lactique empiète sur la fermentation alcoolique (années : 1970, TRAD et MC, 1971 et 1972, MC),

b) les deux fermentations sont strictement parallèles, la fermentation alcolique prend fin après la fermentation malique (1973, TRAD et MC).

TABLEAU I



Ces constatations nous ont incités à nous demander si ces variations n'étaient pas prévisibles, obéissant à certains facteurs considérés ci-dessous.

1. — *Technique de cuvaison*

On constate d'une façon générale (tabl. 1) un déclenchement plus rapide de la fermentation malo-lactique quand on utilise la cuvaison par macération carbonique ; il a été indiqué ailleurs comment on pouvait expliquer cette avance (Bréchot et Chauvet, 1971).

2. — *Données de l'année climatique pendant la maturation du raisin*

Les caractéristiques météorologiques, d'après les relevés de la station météorologique des Bruyères à Charnay-les-Mâcon, ont donné les chiffres inscrits dans le

tableau 2 concernant la pluviométrie et la température observées durant les mois de juillet, août et septembre ; le tableau montre que, si la pluviométrie est anormalement élevée au mois d'août, celle des mois de juillet et septembre restant inférieure ou égale à la normale, la fermentation malo-lactique suit la fermentation alcoolique avec un certain décalage (années 1969 et 1971).

TABLEAU 2

	Pluviométrie			Température		
	hauteur p. 100 de la hauteur normale			écart avec la température normale		
	juil.	août	sept.	juil.	août	sept.
1969	33,1	190,7	63,7	+ 0,6	— 0,9	0
1970	85,9	115,2	109,1	— 1,1	0	— 0,3
1971	34,1	154,5	40,6	+ 1,2	+ 0,5	— 0,9
1972	65,3	51,2	43,5	— 0,7	— 0,8	— 3,2
1973	140	49,5	87,2	— 0,5	+ 1,5	+ 0,7

Nous avons déjà observé ce phénomène pendant les sept années antérieures à 1969 (BRÉCHOT *et al.*, 1969) qui doit être lié à la composition du raisin, l'état sanitaire de la vendange et l'écologie des bactéries.

Les faibles écarts de température observés vis-à-vis de la température normale paraissent sans influence.

3. — *Concentration en sucre réducteur des moûts*

Qu'il s'agisse du sucre réducteur initial dans les moûts ou du sucre réducteur présent au moment du déclenchement de la fermentation malo-lactique (tabl. 3), ce déclenchement ne semble pas dépendre de ces concentrations.

Il est possible d'affirmer que ce déclenchement n'est pas influencé, au moment de l'apparition de la fermentation malo-lactique, par la concentration du sucre réducteur présent dans les moûts de cuvaison, dans les limites de concentration observée. En effet, en 1972 (TRAD) entre autres, ce déclenchement a été observé lorsque les moûts, fermentation alcoolique achevée, n'avaient qu'une teneur en sucres réducteurs inférieure à 1,5 g (avec un pH = 2,98) ; en 1973 (TRAD, MC), ce déclenchement a été observé en présence de 96 à 100 g (avec un pH voisin de 3,1).

4. — *Réaction du milieu et acidité totale initiale*

Le pH initial ne paraît pas intervenir dans l'apparition du phénomène bactérien, par contre l'acidité totale initiale semble être à l'origine du phénomène (tabl. 3.)

TABLEAU 3

	Sucre réducteur initial glucose g/l	Sucre réducteur temps zéro FML glucose g/l	pH initial	Acidité totale initiale g/l SO_4H_2	Acide malique mM		Acidité volatile après FML g/l SO_4H_2
					initiale	temps zéro FML	
1969							
TRAD 1	172,4	⩽ 1,5	2,85	7,44	42	22	0,18
TRAD 2	169	⩽ 1,5	3,10	7,89	44	23	0,19
MC 1	175,4	⩽ 1,5	3,10	7,70	42	17	0,17
MC 2	183,2	⩽ 1,5	3,10	7,79	43	21,5	0,20
1970							
TRAD 1	195	1,3	2,99	6,91	37	16,5	0,17
TRAD 2	200	1,2	2,94	7,1	39,5	17,5	0,19
MC 1	200	15 env.	3,08	6,17	39	27	0,14
MC 2	206	15 env.	3,11	6,5	37	28,5	0,14
1971							
TRAD	273	2	3,00	7,7	29	16	0,34
MC	241	9,6	3,08	6	26	16,5	0,29
1972							
TRAD	163	⩽ 1,5	2,98	6,71	41,5	20,2	0,19
MC	164	9,09	2,89	7,44	40,5	22	0,19
1973							
TRAD	201	96	3,07	4,70	18,5	13,5	0,25
MC	203	100	3,09	4,90	19,5	17,5	0,17

Dès que celle-ci est supérieure à 7,4 g/l en acide sulfurique, la fermentation malo-lactique apparaît après l'achèvement de la fermentation alcoolique.

Il est là aussi possible d'affirmer que le pH n'intervient pas dans l'apparition du phénomène bactérien, dans les limites de pH 2,85 à 3,10.

En ce qui concerne l'acidité totale, remarquons que, bon an mal an, l'acidité tartrique est constante à 10 à 15 p. 100 près ; en revanche, la variation de la teneur en acidité malique est susceptible de varier du simple au double : cette variation est déterminante vis-à-vis de la teneur en acidité totale. Lorsque l'acidité totale est supérieure à 7,4, cette valeur est la conséquence d'une forte concentration malique.

5. — *Concentration initiale de l'acide malique, acidités lactique et volatile apparues*

Ces remarques engagent à considérer la concentration initiale de l'acide malique dans les moûts (tabl. 3).

a) *Concentration en acide malique au moment de l'apparition de la fermentation malo-lactique.*

Lorsque la concentration initiale est supérieure ou égale à 42 mM (millimolécules/l, 5,63 g/l), le phénomène bactérien se manifeste avec retard, après l'achèvement de la fermentation alcoolique. Dans une étude antérieure, cette concentration critique de 42 mM apparaît également (BRÉCHOT *et al.*, 1969).

Si cette même concentration est inférieure ou égale à 42 mM, le décalage est d'autant moins prononcé qu'elle est plus basse.

Il existe une exception toutefois pour la TRAD 1971 où le décalage a eu lieu avec une teneur en acide malique de 29 mM ; il est vrai que l'acidité totale était égale à 7,7. Cependant 1971 n'est pas une année de référence ; la vendange était grêlée, il en résulte une concentration anormale des sucres du moût, une concentration de l'acidité totale (tartrique + malique), une pourriture de 10 p. 100 environ et un pH correspondant relativement élevé.

On doit remarquer que la concentration de l'acide malique au moment du déclenchement du processus bactérien se situe dans une fourchette 16 à 23 mM, exception toutefois en 1970 : MC 27-28,5 mM et en 1973 : TRAD 13,5 mM (tabl. 3).

Nous avons observé qu'en cas de fortes concentrations en acide malique initial l'activité enzymatique du raisin a joué au cours de la macération de la vendange avant le pressurage, l'activité malique des levures également, pour parvenir à cette concentration-seuil (BRÉCHOT *et al.*, 1969).

b) *Acidité lactique apparue : rapport* $\frac{\text{acide lactique L(+) apparu mM}}{\text{acide malique disparu mM}}$, *au cours des différentes étapes de la vinification.*

On sait que la fermentation malo-lactique fait apparaître l'acide lactique L(+) ; la forme D(−) n'étant pas d'origine malique bactérienne, cette forme est toujours en quantité très limitée (BRÉCHOT *et al.*, 1966 ; PEYNAUD *et al.*, 1966).

Les dosages enzymatiques de la forme D(−) ont montré qu'en 1972 et 1973, dans les vins faits, les quantités étaient 2,90-2,38-3,28 et 2,15 mM ; quant à la forme L(+), les quantités correspondantes étaient respectivement 33,3-26,3-18 et 17 mM.

Le tableau 4 montre, le jour du pressurage et en fin de cuvaison, les valeurs du rapport $\frac{\text{acide lactique L(+) apparu mM}}{\text{acide malique disparu mM}}$ dans le jus d'écoulage en fin de macération, le jour du pressurage, dans le jus de presse le jour du pressurage, dans le mélange de ceux-ci en fin de cuvaison, fermentations alcoolique et malo-lactique achevées.

Lorsque la teneur malique initiale des moûts est supérieure à 20 mM, le rapport précité, dans le jus d'écoulage, est toujours inférieur à 1 et parfois nul, ainsi que dans le jus de presse. L'acide malique a disparu dans ces jus par suite de l'activité malique du raisin, des levures, sans apparition concomitante d'acide lactique (PEYNAUD et GUIMBERTEAU, 1962 ; CHAUVET *et al.*, 1963 ; BRÉCHOT *et al.*, 1969 ; BURET et FLANZY, 1970). Après le pressurage, en fin de vinification, ce rapport se rapproche de l'unité par l'effet du clivage malique bactérien.

Il est à noter que c'est avec les macérations carboniques que l'on trouve dans les jus d'écoulage le rapport le plus élevé, ce qui est à l'appui de l'avance prise, dans ces cuvaisons, par le processus bactérien.

TABLEAU 4

Rapport : $\frac{\text{Acide lactique L(+) apparu mM}}{\text{Acide malique disparu mM}}$

	Jour du pressurage		Après pressurage 1 + 2
	écoulage 1	presse 2	fin cuvaison
Année 1969			
TRAD 1	0,08	0	0,83
TRAD 2	0	0	0,84
MC 1	0,13	0	0,74
MC 2	0	0	0,81
Année 1970			
TRAD 1	0,02	0,071	0,76
TRAD 2	0	0	0,92
MC 1	0,31	0,085	0,96
MC 2	0,13	0,056	0,85
Année 1971			
TRAD	0	0	0,86
MC	0	0	0,97
Année 1972			
TRAD	0,04		1,22
MC	0,55		0,93
Année 1973			
TRAD	1,05	0,74	1,2
MC	1,08	0,84	0,75

La campagne 1973 montre que ce rapport est relativement élevé quels que soient les liquides considérés et se rapproche de l'unité.

Entre les quatrième et huitième jours de macération, avant pressurage, les analyses ont donné les chiffres suivants :

	TRAD	MC
Acide malique disparu mM	12	7,5
Acide lactique L(+) apparu mM.....	17,4	13,5
Excès acide lactique L(+) mM	5,4	6

Il faut noter que pendant cette même période de cuvaison l'enrichissement en acide lactique D(–) s'élevait pour chacune des cuvées à 0,8 et 0,86 mM.

Les molécules d'acide L(+) supplémentaires ont sans doute une origine glucidique.

c) *Acidité volatile apparue après fermentation malo-lactique.*

L'examen de l'acidité volatile apparue permet les remarques suivantes (tabl. 3).

Au cours de ces cinq années de campagne, la fourchette de l'acidité volatile se situe entre 0,17 et 0,20 en moyenne dont on peut retrancher 0,1 venant de la fermentation alcoolique ; l'année 1971 n'est pas à retenir pour les raisons indiquées plus haut (§ 5 *a*) ; ce chiffre est remarquablement bas et relativement constant en dépit de la concentration variable du sucre réducteur présent au moment du déclenchement de la dégradation malique bactérienne (tabl. 3) ; l'origine de cet acide acétique est encore inconnue et serait à préciser.

DISCUSSION

Ces résultats mettent en évidence le rôle fondamental de la teneur initiale des moûts en acide malique pour le départ de la dégradation malique bactérienne ; les incidences de l'année climatique, les teneurs en acidité totale initiale ne sont que des facteurs qui contrôlent et représentent cette teneur malique.

D'un autre côté, ils appellent les remarques suivantes concernant l'apparition des acidités lactique et volatile : en 1973, un excès stœchiométrique d'acide lactique L(+) a été décelé vis-à-vis de l'acide malique disparu ; ce métabolisme a eu lieu sans augmentation d'acidité volatile finale, comparé aux mêmes acidités volatiles des campagnes précédentes, où l'acide lactique L(+) apparaît en quantité équimoléculaire avec l'acide malique disparu. S'agit-il d'un métabolisme glucidique bactérien homolactique ?

De plus, en ce qui concerne l'acidité volatile, la pauvreté malique des moûts de 1973 permet d'établir un rapprochement avec les cas de piqûres lactiques constatés dans le vignoble beaujolais, accidents qui se manifestent lorsque la chaptalisation a lieu au terme de la dégradation malique bactérienne.

On sait qu'il a été constaté une microflore bactérienne hétérolactique dominante dans les vignobles languedocien et bordelais (Barre, 1966 ; Peynaud, 1967). Les identifications de bactéries malo-lactiques, que nous avons faites parallèlement à nos observations, ont mis en évidence cette même sélection (Lactobacilles et Leuconostocs hétérolactiques). Il y a donc lieu de préciser le mécanisme régulateur de cette glycolyse hétérolactique en vue d'éviter ces accidents dans le vignoble beaujolais.

Il semble que la concentration en sucre due à la chaptalisation pratiquée dans le vignoble beaujolais, en présence d'une faible teneur ou même d'une absence malique, soit un facteur primordial pour déclencher cet accident acéto-lactique. Nous avons déjà eu l'occasion d'insister ailleurs sur cette cause d'accident (Chauvet *et al.*, 1967).

Nos observations nous conduisent à émettre l'hypothèse que l'acide malique interviendrait comme facteur principal de cette régulation.

CONCLUSIONS

Au cours de ces cinq années de campagne œnologique, il a été constaté que le déclenchement de la fermentation malolactique est sous la dépendance de la concentration initiale des moûts en acide malique [AM].

Avec [AM] > 40 mM, la fermentation malo-lactique suit la fermentation alcoolique avec un intervalle de temps variable.

Si [AM] < 40 mM, la fermentation malo-lactique peut se faire en parallèle avec la fermentation alcoolique.

Lorsque [AM] tombe à 20 mM, le parallélisme des deux fermentations a été absolu et la fermentation alcoolique se poursuit alors que la dégradation malique bactérienne est achevée.

L'acidité volatile constatée pendant ces cinq années est toujours peu élevée et relativement constante.

La piqûre lactique (accident acéto-lactique), qui est liée à une déficience malique au moment de la chaptalisation, a été discutée.

Reçu pour publication en juin 1974.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié d'une subvention de l'Institut technique du Vin, 2, rue de Rigny, Paris 8e, auquel nous adressons nos remerciements.

Nous remercions le Laboratoire de Chimie agricole de Mâcon (Directeur M. Rivoire) qui a bien voulu se charger des principaux dosages enzymatiques, le Laboratoire de la Maison Loron, 71 - Pontanevaux, pour sa collaboration, ainsi que la Station météorologique des Bruyères à Charnay-lès-Mâcon, pour les renseignements transmis.

SUMMARY

EFFECT OF INITIAL MALIC ACID CONCENTRATION OF MUSTS ON STARTING OFF EVOLUTION OF MALOLACTIC FERMENTATION

The observations made in this study show the role of the initial malic acid concentration of Beaujolais musts in starting off malolactic fermentation.

The role of malic acid in heterolactic glycolysis regulation is suggested.

RESUMEN

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION INICIAL DEL ACIDO MALICO DE LOS MOSTOS RESPECTO A LA INICIACION Y LA EVOLUCION DE LA FERMENTACION MALOLACTICA

Las observaciones consignadas en este estudio conducen a evidenciar el papel de la concentración inicial del ácido málico de los mostos del vino de Beujolais para dar comienzo a la fermentación maloláctica.

Se presentan sugerencia respecto el papel del ácido málico en la regulación de la glucólisis heteroláctica.

RIASSUNTO

INFLUENZA DELLA CONCENTRAZIONE INIZIALE DELL'ACIDO MALICO DEI MOSTI SULL'AVVIAMENTO E L'EVOLUZIONE DELLA FERMENTAZIONE MALOLATTICA

Le osservazioni contenute in questo studio mettono in evidenza il ruolo della concentrazione iniziale dell'acido malico dei mosti del Beaujolais per avviare la fermentazione malolattica. E' fatto riferimento al ruolo dell'acido malico nella regolazione della glicolisi eterolattica.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Barre P., 1966. Recherches sur les bactéries lactiques des vins. *Ann. Technol. agric.*, **15**, 173-180.

Bréchot P., Chauvet J., Croson M., Irrmann R., 1966. Configuration optique de l'acide lactique apparu au cours de la fermentation malo-lactique pendant la vinification. *C. R. Acad. Sci.*, **262**, 1605-1607.

Bréchot P., Chauvet J., Croson M., Irrmann R., 1969. Contribution à l'étude des métabolismes de l'acide malique en vinification. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 293-305.

Bréchot P., Chauvet J., 1971. Phénomènes microbiologiques observés au cours de la vinification beaujolaise par macération carbonique. *I. N. R. A., Journées Macération carbonique, Avignon*, 106-119.

Buret M., Flanzy C., 1970. Évolution de l'acide malique au cours de la fermentation intracellulaire des baies de raisin placées en anaérobiose à l'obscurité : influence du cépage et de la température. *C. R. Ac. Agric. Fr.*, **56**, 418-422.

Chauvet J., Bréchot P., Dupuy P., Croson M., Irrmann R., 1963. Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 237-246.

Chauvet J., Bréchot P., Croson M., Irrmann R., 1967. Contribution à l'étude des métabolismes observés dans les deux phases de la macération carbonique de la vendange. *I. N. R. A., 2e Symposium International d'Oenol. Bordeaux-Cognac*, **2**, 249-251.

Hohorst H. J., 1970. In Bergmeyer H. U. : *Methoden der enzymatischen Analyse.* Verlag chemie Weinheim, 2nd edit,. **2**, 1425 et Gawehn K., Bergmeyer H. U., *ibidem*, 1450.

Peynaud E., Guimberteau G., 1962. Modifications de la composition des raisins au cours de la fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 161-167.

Peynaud E., Blouin J., 1965. Comparaison de quelques méthodes de dosage de l'acide *l*-malique. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 61-66.

Peynaud E., Lafon-Lafourcade S., Guimberteau G., 1966. L(+) lactic acid and D(–) lactic acid in wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **14**, 302-307.

Peynaud E., 1967. Études récentes sur les bactéries du vin. *I. N. R. A., 2e Symposium International d'Oenol., Bordeaux-Cognac*, **1**, 219-256.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 421-431.

ÉTUDE DE LA TENEUR ET DE LA RÉPARTITION DES INHIBITEURS TRYPSIQUES DE DIVERS BLÉS DURS (*T. DURUM*) ET BLÉS TENDRES (*T. VULGARE*) PAR UNE MÉTHODE SUR FILM DE GÉLATINE

M.-C. CAMUS et J.-C. LAPORTE

Unité de Recherches diététiques de l'I. N. S. E. R. M.,
Hôpital Bichat,
170, Bd Ney, 75018 Paris

RÉSUMÉ

La teneur en inhibiteurs trypsiques de divers blés durs (*T. durum*) et blés tendres (*T. vulgare*) et la constante de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur sont déterminées en dosant par son action sur film de gélatine la trypsine non inhibée, à concentration constante de trypsine et variable d'inhibiteur. Les blés étudiés ont des teneurs différentes en inhibiteurs trypsiques permettant de les classer en six groupes. Les blés durs se répartissent dans les trois groupes de plus faible teneur, les blés tendres dans les quatre groupes de plus forte teneur, avec une teneur moyenne deux fois moindre pour les blés durs que pour les blés tendres. Les constantes de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur sont plus petites pour les blés tendres que pour les blés durs. Les différences sont peu importantes pour les diverses fractions d'un même blé.

Mots clés : *blé, trypsine, inhibiteurs.*

I. — INTRODUCTION

Dans un travail antérieur portant sur quelques variétés de blés durs et blés tendres (Camus et Laporte, 1973), nous avions mis en évidence une teneur en inhibiteurs trypsiques moindre pour les blés durs que pour les blés tendres.

Nous avons repris cette étude sur d'autres variétés, avec une méthode de dosage des inhibiteurs différente de celle précédemment utilisée. Cette méthode consistait à déterminer, avec de la caséine comme substrat, la fraction non inhibée de trypsine ajoutée en excès par rapport à ces inhibiteurs. L'excès de trypsine est ici dosé sur

TABLEAU I

Blés étudiés

(Cultivés et conservés dans des conditions identiques)

Blés	Numéros	Variétés	Azote (p. 100 du poids frais)
Durs	1	*Agathé*	2,81
	2	*Bidi 17*	2,38
	3	*Durtal*	2,39
	4	*Lakota*	2,33
	5	*Mandon*	1,87
	6	*Montferrier*	2,47
	7	$(L \times C) \times A$*	2,73
	8	$(L \times C) \times A$*	2,77
	9	$(L \times C) \times A$*	2,67
	10	$(L \times C) \times A$*	1,93
Moyenne			$2,43 \pm 0,10$
Tendres	11	*Capitole*	1,98
	12	*Champlein*	1,76
	13	*Chrismar*	1,79
	14	*Étoile de Choisy*	2,08
	15	*Florence* × *Aurore*	2,70
	16	*Goya*	1,94
Moyenne			$2,04 \pm 0,14$

* : (L × C) × A = (*Lakota* × *Champlein*) × *Agathé*.

TABLEAU 2

Fractions de blés durs étudiées

Fractions	p. 100 du produit initial	Azote (p. 100 du poids frais)	
		Blé 1 [1]	Blé 2 [1]
Blé entier	100	2,23	2,53
Remoulage	6	2,60	2,77
Recoupette	15	3,10	3,02
Gruau D	9	2,77	2,67
SSSG	5	2,30	2,22
SSSSE		2,42	2,36
SSSE	63	2,34	2,44
SSSF	2	2,52	2,36

[1] Ces blés sont constitués d'un mélange de blés canadiens (*CWAD*) et de blés de pays (*Wells* et *Lakota*).

film de gélatine, ce qui rend la méthode plus simple et plus rapide. De plus, elle s'effectue en deux temps, l'un situant la valeur cherchée dans un certain intervalle, l'autre en précisant la position dans cet intervalle.

Nous nous sommes aussi intéressés à la répartition des inhibiteurs à l'intérieur du grain en les dosant dans diverses fractions de meunerie et de semoulerie.

II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Les caractéristiques des divers blés et fractions étudiés sont rassemblées dans les tableaux 1, 2, 3.

TABLEAU 3

Fractions de blés tendres étudiées

Fractions	p. 100 du produit initial	Azote (p. 100 du poids frais)	
		Étoile de Choisy	*Rex*
Blé entier	100	1,84	2,22
Gros son	26	2,05	2,63
Son fin	9	2,18	2,37
Farine	65	1,64	2,14

Dosage des inhibiteurs trypsiques (LAPORTE, 1964, 1970)

Rappel théorique.

Soit un inhibiteur d'enzyme agissant par formation réversible d'un complexe inactif enzyme-inhibiteur très peu dissocié selon un équilibre $e + i \rightleftarrows e\,i$, auquel correspond une constante de dissociation :

$$k = \frac{(e)\ (i)}{(ei)}.$$

Les concentrations I d'inhibiteur total, E d'enzyme totale, A d'enzyme active et la constante K de dissociation apparente du complexe enzyme-inhibiteur, sont liées par une relation :

$$F(I, E, A) = A(I - E + A) - K(E - A) = o$$

La surface représentative de cette fonction est un paraboloïde hyperbolique dont les sections par des plans I = constante et E = constante sont des hyperboles F(E, A) = o et F(I, A) = o.

Principe.

On opère à concentration constante de trypsine totale et variable d'inhibiteur.

Dans un premier temps, où l'on considère la dissociation du complexe trypsine-inhibiteur comme négligeable, on détermine, sur une série de dilutions de la solution d'inhibiteur de rapports en progression géométrique de raison 1/2, toutes à la même concentration de trypsine totale ajoutée, les zones où soit l'enzyme soit l'inhibiteur est en excès. Cette détermination est faite en observant, pour un même temps d'action des différentes solutions, la destruction totale ou non de films

de gélatine immergés dans ces solutions, ce même temps étant celui juste nécessaire à la destruction totale du film, par une solution de trypsine de concentration moitié de celle de la trypsine totale. Ceci permet de situer la concentration en inhibiteur trypsique de la solution étudiée entre deux limites allant du simple au double.

Dans un deuxième temps, tenant compte du résultat obtenu et le précisant, on détermine, sur une série de dilutions de rapports en progression arithmétique de raison 1/10 de l'une des dilutions précédentes de la solution d'inhibiteur, toutes à la même concentration de trypsine totale ajoutée, la concentration de trypsine active en fonction de la concentration d'inhibiteur, et on trace la courbe correspondante. On obtient l'une des hyperboles précédentes $F(I, A) = 0$ (fig. 1). Sa tangente au point où elle coupe l'axe des A coupe l'axe des I en un point d'abcsisse $i = E + K$. Le point de même abscisse sur la courbe a une ordonnée a telle que :

$$K = \frac{a^2}{E - 2a},$$

d'où deux équations permettant de déterminer K et la correspondance stoechiométrique entre la trypsine totale et l'inhibiteur. La trypsine active est dosée par son action sur film de gélatine en déterminant le temps juste nécessaire à sa destruction totale.

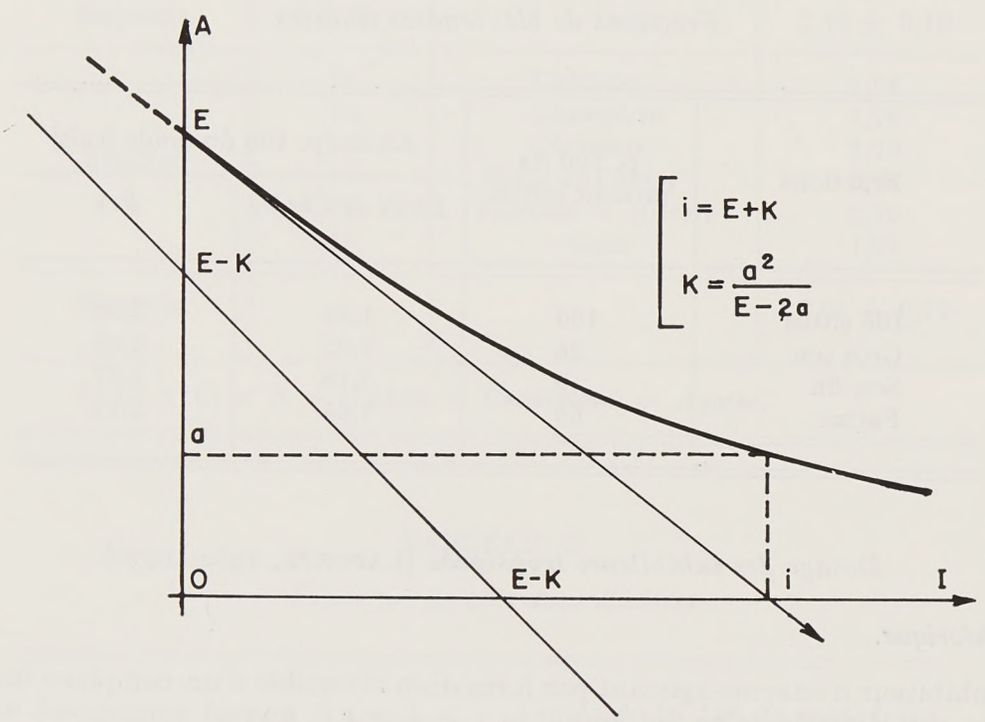


FIG. 1

Mode opératoire.

Les inhibiteurs sont extraits à 0°C par homogénéisation à l'Ultra-Turrax et centrifugation de 1 gramme de produit dans 16 ml de tampon phosphate de sodium, pH = 7,0- 0,05 M, et sont dosés dans le surnageant. Les différentes fractions de meunerie et de semoulerie sont traitées directement, les grains entiers sont préalablement broyés au moulin à poivre.

Premier temps.

Dans une série de 6 tubes 75 × 13 mm en plastique numérotés de 6 à 12, on met 0,5 ml d'une solution de trypsine (trypsine lyophylisée Armour à 3 280 Unités National Formulary (UNF)/mg) dans le tampon phosphate de sodium, pH = 7,0- 0,05 M, à la concentration de 4 UNF/ml dans tous les tubes sauf le tube 6 et à la concentration de 8 UNF/ml dans le tube 6. On prend 0,5 ml du surnageant que l'on porte dans le tube 6 et après aspiration et refoulement, on prend 0,5 ml du mélange que l'on porte dans le tube 7, etc. La série de tubes est mise au bain thermostaté à 37°C. Après 5 minutes, on laisse tomber verticalement au fond de chaque tube un film de gélatine (morceau d'environ 8 mm de large d'un film photographique Kodak Panatomic X 35 mm coupé transversalement) pour lequel on a préalablement déterminé le temps t_2 juste nécessaire à sa destruction totale par une solution (dans le tampon phosphate) de trypsine à

2 UNF/ml. Le temps t_2, de l'ordre de 15 minutes, est le même pour tout film de même numéro de fabrication, mais peut varier avec ce numéro. Au temps t_2, soit y le numéro du dernier tube de la série où il n'y a pas destruction totale du film, celle-ci étant totale dans le tube $(y + 1)$. La teneur x du produit en inhibiteurs, exprimée en UNF trypsiques inhibées par gramme de produit, est telle que :

$$2^y < x \leqslant 2^{(y+1)} \qquad \text{soit} \qquad x = (3 \pm 1)\, 2^{(y-1)}.$$

Pratiquement les résultats sont lus directement dans le tableau 4.

Par exemple, si, au temps t_2, la destruction du film n'est pas totale dans le tube 8, mais l'est dans le tube 9, la teneur en inhibiteurs du produit étudié est comprise entre 256 et 512 UNF trypsiques inhibées par gramme de produit.

TABLEAU 4

Lecture du résultat du dosage des inhibiteurs trypsiques

(1er temps, cas particulier de l'étude présente)

Numéro des tubes	Teneur en inhibiteurs du produit étudié (UNF trypsiques inhibées par gramme)
n	2^n
6	64
7	128
8	256
9	512
10	1 024
11	2 048
12	4 096

Remarques.

1. Le premier tube de la série est numéroté 6 car il correspond à la dilution dans le rapport $\frac{1}{2^{(6-1)}}$ de la solution d'un tube 1 virtuel. Cette solution considérée par définition comme non diluée, et donc de rapport de dilution égal à $1 = \frac{1}{2^{(1-1)}}$, contiendrait par ml les inhibiteurs de 1 gramme de produit.

2. D'une manière plus générale et pour une série de dilutions de rapports en progression géométrique de raison 1/2 d'une solution d'inhibiteur trypsique non diluée dans le tube 1, le rapport de dilution de la solution du tube n est $\frac{1}{2^{(n-1)}}$. Si, de plus, la concentration de trypsine ajoutée dans chaque tube est non plus 4 UNF/ml mais 2 e, et si le repérage des films détruits ou non se fait non plus au temps t_2 correspondant à une concentration 2 UNF/ml de trypsine mais au temps t_e correspondant à une concentration e de trypsine, la concentration X en inhibiteurs trypsiques de la solution du tube 1 est telle que :

$$2^{(Y-1)} \cdot e < X \leqslant 2^Y \cdot e,$$

Y étant le numéro du dernier tube de la série où il n'y a pas destruction totale du film, celle-ci étant totale dans le tube $(Y + 1)$.

Là encore les résultats sont lus directement dans le tableau 5.

Par exemple, si $2e = 10$ UNF/ml et si au temps t_5 la destruction du film n'est pas totale dans le tube 3 mais l'est dans le tube 4, la teneur en inhibiteurs de la solution étudiée est comprise entre 20 et 40 UNF trypsiques inhibées par ml de solution.

TABLEAU 5

Lecture du résultat du dosage des inhibiteurs trypsiques

(1er temps, cas général d'une solution quelconque et d'une concentration $2e$ de trypsine ajoutée, le repérage des films détruits ou non étant fait au temps t_e juste nécessaire à leur destruction par une concentration e de trypsine)

Numéro des tubes	Rapport de dilution de la solution initiale	Teneur en inhibiteurs de la solution initiale (trypsine inhibée exprimée avec les mêmes unités que e, par ex. U/ml ou mg/ml ou M)
n	$1/2^{(n-1)}$	$2^{(n-1)} \cdot e$
1	1/1	$1e$
2	1/2	$2e$
3	1/4	$4e$
4	1/8	$8e$
5	1/16	$16e$
.	.	.
.	.	.
.	.	.

Deuxième temps.

Dans une série de tubes 75 × 13 mm en plastique numérotés de 0 à 8, on met :

— 0, 100, ... 700, 800 µl du surnageant à la dilution (dans le tampon phosphate) du tube $(y - 1)$,
— 800, 700, ..., 100, 0 µl de tampon phosphate de sodium, pH = 7,0- 0,05 M,
— 200 µl d'une solution (dans le tampon phosphate) de trypsine à 20 UNF/ml.

La série de tubes est mise au bain thermostaté à 37°C. Après 5 minutes d'incubation, on laisse tomber verticalement au fond de chaque tube un film de gélatine (cf. 1er temps), dont on a préalablement établi une courbe d'étalonnage donnant le temps juste nécessaire à sa destruction totale en fonction de la concentration de trypsine (cette courbe est linéaire en coordonnées logarithmiques). On détermine pour chaque tube le temps juste nécessaire à la destruction totale du film et on le reporte sur la courbe d'étalonnage, ce qui donne la concentration de trypsine active dans chaque tube. Pour des concentrations de trypsine allant de 50 à 0,1 UNF/ml, les temps correspondants sont de l'ordre de 5 à 60 minutes. Ces temps sont les mêmes pour tout film de même numéro de fabrication, mais peuvent varier avec ce numéro. On trace la courbe de la concentration de trypsine active en fonction du volume de la solution d'inhibiteur. On trace la tangente à la courbe au point où elle rencontre l'axe de la concentration de trypsine active et on applique les formules données précédemment en remplaçant le volume de la solution d'inhibiteur par la concentration correspondante du produit initial. Les teneurs sont ici exprimées en nombre de moles d'inhibiteurs par gramme de produit ou d'azote du produit et les constantes de dissociation apparente en moles par litre, en admettant pour la trypsine pure une masse molaire de 24 000 et une activité de 3 280 UNF/mg.

Calculs statistiques.

Les résultats sont des valeurs moyennes suivies de leur écart-type et du nombre d'expériences : $M \pm s_M$ (n). La signification statistique des différences est évaluée par analyse de variance selon le test de Fisher-Snedecor. Les calculs sont faits avec les programmes de Lowy et Manchon (1968, 1969). Les différences sont considérées comme très significatives pour un seuil de probabilité $P < 0,01$, significatives pour un seuil de probabilité $0,01 < P < 0,05$, non significatives pour un seuil de probabilité $P < 0,05$.

III. — RÉSULTATS

La teneur en inhibiteurs trypsiques et la constante de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur sont données pour les divers blés dans le tableau 6 et pour les diverses fractions dans les tableaux 7 (blés durs) et 8 (blés tendres).

TABLEAU 6

Inhibiteurs trypsiques de divers blés

Teneurs T_1 (10^{-9} mole/g de produit) et T_2 (10^{-9} mole/g d'azote du produit), constante de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur K (10^{-9} mole/l). M $\pm$ s_M (4)

Blés	Numéros	Variétés	T_1	T_2	K
Durs	3	*Durtal*	2,7 ± 0,1	112 ± 4	1,7 ± 0,1
	10	(*L* × *C*) × *A**	3,2 ± 0,1	164 ± 7	3,1 ± 0,1
	5	*Mandon*	4,0 ± 0,1	212 ± 5	4,1 ± 0,4
	4	*Lakota*	6,8 ± 0,2	293 ± 8	9,3 ± 0,5
	1	*Agathé*	6,9 ± 0,1	246 ± 5	10,3 ± 0,3
	9	(*L* × *C*) × *A**	7,0 ± 0,2	261 ± 6	9,2 ± 0,7
	8	(*L* × *C*) × *A**	7,7 ± 0,2	278 ± 8	8,7 ± 0,6
	6	*Montferrier*	7,7 ± 0,2	312 ± 9	6,8 ± 0,4
	2	*Bidi 17*	7,7 ± 0,2	325 ± 10	8,5 ± 0,4
	7	(*L* × *C*) × *A**	9,8 ± 0,3	360 ± 10	14,3 ± 0,5
Moyenne			6,3 ± 0,3	257 ± 12	7,6 ± 0,6
Tendres	15	*Florence* × *Aurore*	9,7 ± 0,3	360 ± 13	2,4 ± 0,1
	13	*Chrismar*	11,2 ± 0,2	627 ± 13	1,4 ± 0,1
	12	*Champlein*	13,2 ± 0,1	753 ± 7	2,2 ± 0,2
	11	*Capitole*	13,9 ± 0,3	704 ± 15	1,4 ± 0,1
	14	*Étoile de Choisy*	16,3 ± 0,5	782 ± 22	1,0 ± 0,1
	16	*Goya*	17,1 ± 1,3	876 ± 70	1,3 ± 0,1
Moyenne			13,7 ± 0,6	682 ± 35	1,6 ± 0,2

* : (*L* × *C*) × *A* = (*Lakota* × *Champlein*) × *Agathé*.

Pour ce qui est des divers blés, en ce qui concerne leur teneur en inhibiteurs trypsiques rapportée tant au produit qu'à son azote, on constate des différences de deux sortes, grandes et (très) significatives, permettant de classer les divers blés en groupes à l'intérieur desquels les différences sont plus petites et non significatives.

En rapportant les teneurs au produit, on distingue six groupes : un premier comprenant les blés 14, 16, un deuxième les blés 11, 12, un troisième le blé 13, un quatrième les blés 15, 7, un cinquième les blés 7, 2, 3, 6, 8, 9, un sixième les blés 3, 5, 10. Les blés durs se situent dans les trois groupes de plus faible teneur, les blés tendres dans les quatre groupes de plus forte teneur, l'un des groupes comportant

TABLEAU 7

Inhibiteurs trypsiques de diverses fractions de blés durs

Teneurs T_1 (10^{-9} mole/g de produit) et T_2 (10^{-9} mole/g d'azote du produit), constante de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur K (10^{-9} mole/l). M $\pm$ s_M (4)

Blés*	Fractions	T_1	T_2	K
1	Blé entier	6,1 $\pm$ 0,1	275 $\pm$ 4	5,6 $\pm$ 0,1
	Remoulage	9,9 $\pm$ 0,3	380 $\pm$ 10	8,0 $\pm$ 0,2
	Recoupette	13,7 $\pm$ 0,3	441 $\pm$ 10	5,3 $\pm$ 0,1
	Gruau D	7,9 $\pm$ 0,3	287 $\pm$ 10	6,3 $\pm$ 0,4
	SSSG	6,6 $\pm$ 0,4	288 $\pm$ 17	9,4 $\pm$ 0,1
	SSSSE	6,0 $\pm$ 0,3	246 $\pm$ 12	9,3 $\pm$ 0,6
	SSSE	6,0 $\pm$ 0,1	255 $\pm$ 6	9,7 $\pm$ 0,2
	SSSF	5,5 $\pm$ 0,4	218 $\pm$ 15	5,0 $\pm$ 0,2
2	Blé entier	7,2 $\pm$ 0,3	286 $\pm$ 14	6,8 $\pm$ 0,2
	Remoulage	10,2 $\pm$ 0,5	367 $\pm$ 17	9,6 $\pm$ 0,2
	Recoupette	9,5 $\pm$ 0,4	314 $\pm$ 13	4,5 $\pm$ 0,2
	Gruau D	7,4 $\pm$ 0,1	279 $\pm$ 5	12,9 $\pm$ 0,4
	SSSG	6,2 $\pm$ 0,2	281 $\pm$ 7	10,7 $\pm$ 0,7
	SSSSE	5,2 $\pm$ 0,3	220 $\pm$ 14	14,1 $\pm$ 0,7
	SSSE	6,0 $\pm$ 0,2	244 $\pm$ 7	12,2 $\pm$ 0,5
	SSSF	6,3 $\pm$ 0,2	268 $\pm$ 10	5,0 $\pm$ 0,2

* Il s'agit des blés du tableau 2.

TABLEAU 8

Inhibiteurs trypsiques de diverses fractions de blés tendres

Teneurs T_1 (10^{-9} mole/g de produit) et T_2 (10^{-9} mole/g d'azote du produit), constante de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur K (10^{-9} mole/l). M $\pm$ s_M (4)

Blés	Fractions	T_1	T_2	K
Étoile de Choisy	Blé entier	15,6 $\pm$ 0,5	850 $\pm$ 29	1,2 $\pm$ 0,1
	Gros son	16,7 $\pm$ 1,3	815 $\pm$ 62	1,6 $\pm$ 0,1
	Son fin	22,6 $\pm$ 0,4	1 039 $\pm$ 19	1,6 $\pm$ 0,1
	Farine	16,8 $\pm$ 0,8	1 026 $\pm$ 46	1,2 $\pm$ 0,1
Rex	Blé entier	6,2 $\pm$ 0,4	279 $\pm$ 16	2,4 $\pm$ 0,1
	Gros son	8,6 $\pm$ 0,6	326 $\pm$ 22	1,7 $\pm$ 0,1
	Son fin	8,5 $\pm$ 0,2	357 $\pm$ 8	1,4 $\pm$ 0,1
	Farine	6,0 $\pm$ 0,3	278 $\pm$ 12	4,0 $\pm$ 0,1

des blés des deux espèces. En rapportant ces teneurs à l'azote, le classement en groupes subit seulement quelques modifications de détail, la teneur des blés tendres restant plus importante que celle des blés durs. En ce qui concerne les constantes de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur, on pourrait de même faire une classification en sept groupes, les blés durs se situant dans les six groupes de plus forte valeur, les blés tendres dans les deux groupes de plus faible valeur. De toute façon, les moyennes sont les plus grandes pour les blés tendres en ce qui concerne les teneurs, et pour les blés durs en ce qui concerne les constantes de dissociation.

Pour ce qui est des diverses fractions, en ce qui concerne leur teneur en inhibiteurs trypsiques rapportée au produit, on constate une tendance à des valeurs plus importantes pour les issues que pour le blé entier, la farine (blés tendres) et les semoules (blés durs). Rapportée à l'azote, ces différences tendent à s'estomper. En ce qui concerne les constantes de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur, on constate certaines différences parfois très significatives, mais non représentatives de telle ou telle fraction. Néanmoins, ces valeurs restent plus élevées pour les blés durs que pour les blés tendres.

IV. — DISCUSSION

Nous constatons donc une teneur en inhibiteurs trypsiques plus grande pour les blés tendres que pour les blés durs et une constante de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur plus grande pour les blés durs que pour les blés tendres. En ce qui concerne les teneurs, nous retrouvons des résultats déjà obtenus par nous précédemment pour d'autres variétés, avec encore une distribution en groupes dont certains peuvent être assimilés à ceux de la distribution précédente (Camus et Laporte, 1973). Par contre, nous n'avions pas constaté de telles différences entre les constantes de dissociation, qui sont des constantes de dissociation apparente dans les conditions de la mesure et donc comme telles liées à la méthode, au substrat (dans l'étude précédente, le substrat était de la caséine en solution, alors qu'ici il s'agit de films de gélatine) et au type d'inhibition. Nous avons en effet vérifié sur deux mêmes variétés que les deux méthodes donnent des résultats concordants en ce qui concerne les teneurs mais non plus en ce qui concerne les constantes de dissociation. Par ailleurs, les courbes d'inhibition n'étaient pas toujours purement hyperboliques mais parfois légèrement sigmoïdales. Il nous est difficile de dire s'il s'agit là d'un phénomène réel ou d'un artefact lié à la méthode. Cependant, l'inhibition que nous avons obtenue avec de l'inhibiteur pur de soja ne donnait pas lieu à un tel phénomène. D'autre part, dans l'optique d'une interprétation analogue à celle donnée à propos de l'inhibition trypsique due au sérum où ce phénomène se manifeste (intervention de certaines protéines) (Bieth, Metais et Warter, 1968), l'inhibiteur pur de soja auquel nous avons ajouté un extrait de blé où l'inhibiteur avait été détruit par le chauffage donnait une courbe d'inhibition hyperbolique, de même qu'un extrait de farine de soja. Quoi qu'il en soit, ce phénomène demanderait à être réexaminé avec une méthode plus précise, et en première approximation, nous l'avons négligé dans nos calculs.

V. — CONCLUSION

Par une méthode différente et sur des variétés autres que celles étudiées précédemment, nous retrouvons une teneur en inhibiteurs trypsiques plus importante pour les blés tendres que pour les blés durs, avec une classification en groupes qui paraît se maintenir mais demanderait une étude plus approfondie. Cette méthode permet de différencier les constantes de dissociation apparente des complexes trypsine-inhibiteur, plus grandes pour les blés durs que pour les blés tendres. Les diverses fractions obtenues tant en meunerie qu'en semoulerie présentent peu de différences de teneur, avec peut-être des valeurs un peu supérieures pour les issues.

Reçu pour publication en août 1974.

REMERCIEMENTS

Les échantillons étudiés nous ont été très aimablement fournis par M. P. GRIGNAC, maître-assistant à l'École nationale supérieure agronomique de Montpellier (blés du tableau 1), et M. P. GRANDVOINNET, directeur scientifique aux Grands Moulins de Pantin (blés et leurs fractions des tableaux 2 et 3). Nous les en remercions très vivement.

SUMMARY

STUDY OF THE CONTENT AND DISTRIBUTION OF THE TRYPSIN-INHIBITORS OF DIFFERENT WHEATS (*T. DURUM* AND *T. VULGARE*) WITH A METHOD ON GELATINE FILM

The content of trypsin-inhibitors of various wheats (*T. durum* and *T. vulgare*) and the appearent dissociation constant of trypsin-inhibitor complexes were determined by measuring non inhibited trypsin by its action on gelatine film, at constant trypsin concentration and variable inhibitor concentration. The types of wheats studied contained different amounts of trypsin-inhibitors which enabled them to be classified into six groups. *T. durum* fall into the three weakest groups, *T. vulgare* into the four strongest groups. *T. vulgare* contained in average twice as much inhibitors as *T. durum*. The appearent dissociation constant of trypsin-inhibitor complexes of *T. durum* were higher than the value obtained for *T. vulgare*. Slight differences between various milling fractions of the same wheat were observed.

ZUSAMMENFASSUNG

UNTERSUCHUNGEN ÜBER GEHALT UND VERTEILUNG VON TRYPSIN-INHIBITOREN VON VERSCHIEDENEN HARTWEIZEN (*T. DURUM*) UND WEICHWEIZEN (*T. VULGARE*) DURCH EINE METHODE AUF GELATINEFILM

Der Gehalt an Trypsin-Inhibitoren von Hartweizen (*T. durum*) und Weichweizen (*T. vulgare*) und die zugehörige Dissoziationskonstante der Trypsin-Inhibitor-Komplexe werden bestimmt, indem das ungehemmte Trypsin, entsprechend seiner Wirkung, auf dem Gelatinefilm dosiert wird. Dabei wird die Konzentration des Trypsin konstant gehalten, diejenige des Inhibitors

verändert. Die untersuchten Weizen haben verschiedene Gehalte an Trypsininhibitoren, die es erlauben, die in sechs Gruppen einzuteilen. Die Hartweizen verteilen sich auf die drei Gruppen mit dem geringsten Gehalt, die Weichweizen auf die vier Gruppen mit dem höheren Gehalt. Der mittlere Gehalt ist für die Hartweizen zweimal kleiner als für die Weichweizen. Die entsprechenden Dissoziationskonstanten für die Trypsin-Inhibitor-Komplexe sind für die Weichweizen Kleiner als für die Hartweizen. Die Differenzen für die verschiedenen Fraktionen des selben Weizens sind unbedeutend.

RIASSUNTO

STUDIO DEL TENORE E DELLA RIPARTIZIONE DEGLI INIBITORI TRIPSICI DI DIVERSI GRANI DURI (*T. DURUM*) E TENERI (*T. VULGARE*) MEDIANTE UN METODO SU FILM DI GELATINA

Il tenore di inibitori tripsici di diversi grani duri (*T. durum*) e teneri (*T. vulgare*) e la costante di dissociazione apparente dei complessi tripsina-inibitore sono determinate dosando mediante la sua azione su film di gelatina, la tripsina non inibita, a concentrazione costante di tripsina e variabile d'inibitore. I grani studiati hanno dei tenori diversi di inibitori tripsici che permettono di classificarli in sei gruppi. I grani duri si suddividono nei tre gruppi con tenore più debole ; i grani teneri nei quattro gruppi con un tenore più forte, con un tenore medio due volte inferiore per i grani duri rispetto ai grani teneri. Le costanti di dissociazione apparente dei complessi tripsina-inibitore sono più piccole per i grani teneri rispetto ai grani duri. Le differenze sono poco rilevanti per le diverse frazioni di uno stesso tipo di grano.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bieth J., Metais P., Warter J., 1968. Activation, inhibition and protection of tryptic and α-chymotryptic activity by normal human serum. *Clin. chim. Acta*, **20**, 69-80.

Camus M.-C., Laporte J.-C., 1973. Teneurs en inhibiteurs trypsiques de divers blés, durs et tendres. *Ann. Technol. agric.* **22**, 111-120.

Laporte J.-C., 1964. *Mise en évidence et étude de facteurs antiprotéolytiques dans les céréales.* Thèse 3e cycle, Paris.

Laporte J.-C., 1970. *Activation et sécrétion des enzymes pancréatiques.* Thèse Sciences, Paris.

Lowy R., Manchon P., 1968-1969. *Éléments de statistique appliqués à la biologie.* 3 vol., Olivetti, Paris.

National Formulary, 1970. 746-747, 13th ed., American pharmaceutical Association, Washington.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 433-449.

STADE DE DÉVELOPPEMENT PHYSIOLOGIQUE DES HARICOTS VERTS A LA RÉCOLTE ET QUALITÉ DU PRODUIT SURGELÉ FINI

I. — Tests objectifs de la qualité des haricots verts frais destinés a la congélation

J. PHILIPPON et M.-A. ROUET-MAYER

Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux,
Station du Froid du C. N. R. S.,
4 ter, route des Gardes,
92190 Meudon

RÉSUMÉ

Cette étude a pour buts de :

a) rechercher les meilleurs repères objectifs de la qualité des haricots verts frais ;
b) analyser l'incidence du stade d'évolution physiologique des gousses à la récolte sur la qualité du produit surgelé fini ;
c) définir, à partir des données objectives ainsi recueillies, le stade de récolte optimal.

Après une étude bibliographique des travaux déjà parus, on a conduit pendant deux années consécutives une série d'essais systématiques portant sur plusieurs classes de calibre de 3 variétés de haricots mange-tout : *Tenderette, Corène, Prélude.*

Les principaux résultats obtenus montrent que :

1° Si le calibre constitue un bon critère de qualité pour des fruits en cours de croissance, il n'est plus valable lorsque ceux-ci sont parvenus à la taille adulte. La teneur en matière sèche ou le rapport poids des graines/poids des gousses pleines (g/G) constituent alors les paramètres les meilleurs.

2° Le point d'intersection des courbes représentatives de l'évolution au cours du temps des matières sèches et du rapport g/G, fournit un moyen de mesure objectif du caractère variétal responsable du développement des graines plus ou moins tardif dans les fruits.

3° Le rendement pondéral de la récolte totale des gousses passe au cours du temps par un maximum puis tend ensuite à régresser.

4° Sur chacun des points étudiés, la variété *Tenderette* s'est avérée supérieure à *Corène* pour la congélation.

Mots clés : *haricot vert, surgélation, physiologie, tests de qualité.*

I. — INTRODUCTION

La qualité des haricots verts mange-tout (et de tous les légumes en général) dépend dans une large mesure de la valeur de la matière première fraîche utilisée. Or celle-ci est pour beaucoup tributaire du degré d'évolution physiologique des gousses au moment de leur récolte. C'est pourquoi il nous a semblé utile d'analyser dans le détail les conséquences que pouvait avoir le moment de la récolte sur la qualité organoleptique finale de haricots verts surgelés.

Une telle étude exigeait de pouvoir repérer avec une précision acceptable l'état de développement des gousses, ce qui est toujours assez délicat.

Le seul critère de qualité utilisé dans l'industrie est basé sur le calibre des gousses. Or, dans un même calibre, on trouve des fruits d'âges différents, et les graines des gousses âgées sont les plus développées, ce qui nuit à la qualité du produit (Robinson *et al.*, 1964 ; Olivier et Bannerot, 1971).

En outre, entre deux lots de haricots verts de même calibre, l'un provenant d'une variété à gros fruits, l'autre d'une variété à gousses plus petites, celles du premier lot seront plus jeunes, donc plus appréciées que les autres par le consommateur (Olivier et Bannerot, 1971). Enfin la qualité des haricots est, quel que soit leur calibre, influencée par la pluviosité ou les irrigations (Bolly *et al.*, 1967). On a cherché depuis longtemps à définir d'autres tests susceptibles de mieux rendre compte de l'état d'évolution des gousses de haricots verts à la récolte. Des mesures de dureté et de fibrosité ont été expérimentées (Culpepper, 1936 ; Rowe et Bonney, 1936). Fox et Kramer (1966) ont trouvé une bonne corrélation entre la mesure objective de la texture au moyen de l'appareil Shear Press et l'appréciation sensorielle de la texture, de l'apparence et de la flaveur des haricots verts. Les corrélations obtenues ont été trouvées meilleures sur le produit cuit que lorsqu'il est cru. Ces résultats n'ont cependant pu être confirmés par les chercheurs du Centre technique de la Conserve des Produits agricoles (Anon., 1972). D'autres auteurs ont observé que des tests biométriques simples, tels que la mesure de la longueur et de la largeur des graines, pouvaient donner de bonnes indications (Gould, 1951 ; Carr et Skene, 1961 ; Jones et Corner, 1962 ; Arthey et Webb, 1967 ; Farkas, 1967). Cependant, Board et Coote en 1959 et Gardiner et Prendiville en 1970 ont constaté que les résultats obtenus varient avec la saison, la variété et la région. L'intérêt du test fondé sur le pourcentage en poids de graines par rapport aux gousses a également été signalé (Culpepper, 1936 ; Rowe et Bonney, 1936 ; Gould, 1951 ; Arthey et Webb, 1967 ; Farkas, 1967 ; Webb, 1969). How et Heydecker (1968) ont toutefois observé que les variétés précoces, dont le développement des gousses est rapide, présentent, pour un même pourcentage de graines (en poids), une qualité organoleptique supérieure à celle des variétés tardives qui se développent plus lentement. Ces auteurs estiment que 10 p. 100 de graines peuvent être tolérés dans les variétés précoces alors que ce taux ne devrait pas dépasser 5 p. 100 dans les variétés tardives. Des tests basés sur le dosage de l'extrait sec insoluble dans l'alcool (AIS) ainsi que sur la mesure de la teneur en matière sèche (MS) des haricots verts ont également été jugés très satisfaisants (Gould, 1951 ; Arthey et Webb, 1967 ; Farkas, 1967).

Par ailleurs, POLESELLO, CRIVELLI et LOCATELLI (1972), JONES et CORNER (1962) et GARDINER (1970) ont montré qu'il existe, chez les haricots mange-tout, une forte corrélation positive entre la teneur en MS et l'AIS. Le dernier auteur cité a vérifié que ces deux paramètres chimiques restent valables quelles que soient la saison et la variété.

Récemment, POLESELLO, CRIVELLI et LOCATELLI (1972) ont étudié, en cours de végétation, l'évolution de l'extrait insoluble dans l'alcool (AIS) sur un échantillonnage de haricots verts correspondant à 80 p. 100 de la récolte du moment. Ils ont constaté que l'AIS régresse au cours du temps, passe par un minimum entre le douzième et le quatorzième jour suivant l'anthèse, puis augmente à nouveau. Mais ces données ont été obtenues à partir d'un échantillon constitué de fruits parvenus à des degrés d'évolution très variables ; de ce fait, elles ne rendent pas compte des fluctuations de l'AIS du calibre dominant au moment de la récolte, c'est-à-dire de celui correspondant à la taille adulte des gousses. De plus, lorsque la teneur en AIS devient minimale, la teneur en MS moyenne des lots se situe autour de 8,5 p. 100. On a alors affaire à des haricots très jeunes dont la production à l'hectare est encore faible.

En résumé, il ressort, à la lumière de la littérature citée, que les deux tests les plus aptes à traduire, pour le moment, le degré d'évolution physiologique et la qualité des haricots verts à l'état frais sont le pourcentage en poids des graines par rapport aux gousses et la teneur en matière sèche. C'est pourquoi nous les avons finalement retenus, nous réservant d'en vérifier en cours d'essai la validité sur chaque classe de calibre de 3 variétés de haricots verts mange-tout de grande culture.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette étude a été poursuivie pendant deux années consécutives. Trois variétés, *Prélude*, *Corène*, *Tenderette*, ont été étudiées en 1970 et deux en 1971, *Corène* et *Tenderette*. Elles ont été produites par la Station centrale d'Amélioration des Plantes de l'I. N. R. A. à Versailles. Chaque variété a été produite sur deux parcelles distinctes d'égale superficie afin d'obtenir une répétition. Les parcelles étaient composées de 18 rangées d'égale longueur comprenant chacune 120 à 140 pieds. Lors d'un contrôle, une rangée entière était arrachée puis transportée aussitôt à notre laboratoire où la totalité de la récolte était détachée des plants puis classée par calibres. Les mesures et les dosages n'ont été effectués que sur les 3 calibres principaux adoptés dans l'industrie : 6,5-8 ; 8-10,5 et 10,5-13 (les 2 nombres expriment, en millimètres, l'intervalle à l'intérieur duquel est compris le plus grand diamètre des gousses).

Les récoltes ont eu lieu tous les 3 ou 4 jours à partir du quinzième jour environ ayant suivi la pleine floraison. On a effectué simultanément les mesures suivantes : poids moyen des gousses, calcul de la proportion de gousses dans chaque calibre (en poids), poids des graines dans 100 g de gousses avant égrenage (rapport g/G), teneur en matière sèche des graines, du péricarpe et des fruits entiers.

En outre, une partie des haricots de chaque calibre a été congelée en 6 à 8 minutes par immersion intermittente dans un bain d'azote liquide après avoir été blanchie pendant 2 minutes dans l'eau bouillante. Les haricots ainsi traités ont été emballés en sachets de polyéthylène thermosoudables, puis entreposés pendant 2 mois à — 18°C jusqu'à la dégustation.

Examinons à présent les conditions dans lesquelles les différents contrôles ont été effectués.

a) Poids moyen des gousses : il a été obtenu en divisant la masse des haricots récoltés dans chaque calibre par le nombre de gousses ; les valeurs que nous indiquons représentent donc une moyenne effectuée sur plusieurs centaines d'individus.

b) Proportion de gousses dans chaque calibre : la masse des gousses de chaque calibre a été exprimée en pourcentage de la masse totale de la récolte.

c) Poids des graines dans 100 g de gousses avant égrenage : il a été calculé sur 4 ou 5 fois 20 gousses, les pesées du péricarpe et des graines étant effectuées toutes les fois que 20 gousses étaient écossées afin de limiter la perte de poids par déshydratation.

d) Teneurs en matière sèche (MS) : elles ont été déterminées par la dessiccation de 100 g de produit frais dans une étuve à 105°C pendant 48 heures. Les valeurs sont données en grammes par 100 g de produit frais.

e) Dégustations : la qualité organoleptique est évaluée par un jury composé de 10 à 12 personnes (personnel de laboratoire) qui comparent 5 à 6 lots préalablement cuits à l'eau dans des conditions standard et salés à raison de 13 g de sel par litre d'eau. Les notes sont attribuées suivant une échelle de cotation allant de 0 (inconsommable) à 5 (excellent) ; leur moyenne arithmétique est prise en considération. L'absence d'un échantillon de référence qui aurait été commun à toutes les séances de dégustation ne nous a pas permis de comparer les résultats de deux séances distinctes. Il n'y a donc que les différences entre lots dégustés simultanément qui aient une valeur significative.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. — *Variation du poids moyen des gousses de chaque calibre en fonction du temps*

Les graphiques de la figure 1 réunissent les résultats obtenus sur 3 variétés, *Prélude, Corène* et *Tenderette,* récoltées en 1970 et 1971. Comme nous pouvions nous y attendre, nous constatons que le poids moyen d'une gousse est d'autant plus important que son calibre est plus élevé. Si nous comparons d'une année à l'autre le poids moyen des gousses de même variété et de même calibre, nous remarquons que les fruits de 1971 sont toujours plus lourds que ceux de 1970. L'observation est valable quels que soient le calibre et la variété considérés. Nous avons ici la confirmation de ce que nous avions constaté lors de la cueillette, à savoir que les gousses de la récolte 1971 étaient mieux « venues », et par conséquent étaient plus longues que celles de l'année précédente. La raison en est que, la première année d'essai, la culture a subi les conséquences néfastes d'une période de sécheresse exceptionnelle et d'une forte attaque de « graisse » (*Pseudomonas phaseolica* ou *Xanthomonas phaseoli*). Il en est résulté une diminution importante de la production en quantité et en qualité.

2. — *Évolution du poids des graines de 100 g de fruits en fonction du temps* (rapport g/G)

La figure 2 représente l'évolution du rapport g/G en fonction de la date de récolte. On constate que si la valeur du rapport g/G évolue peu chez les fruits en cours de croissance, calibres 6,5-8 pour *Prélude* et *Corène,* 6,5-8 et 8-10,5 pour *Tenderette,* elle augmente par contre très vite lorsque ceux-ci ont atteint la taille adulte : 8-10,5 et plus pour *Prélude* et *Corène,* 10,5-13 et plus pour *Tenderette* (en fait, à la fin de leur croissance, les gousses de cette dernière variété se classeraient plutôt à l'intérieur du calibre 11,5-14).

3. — *Évolution par calibre de la teneur en matière sèche* (MS) *des gousses au cours du temps*

Comme on le constate sur la figure 3, la MS évolue dans le même sens que le rapport g/G représenté sur la figure précédente.

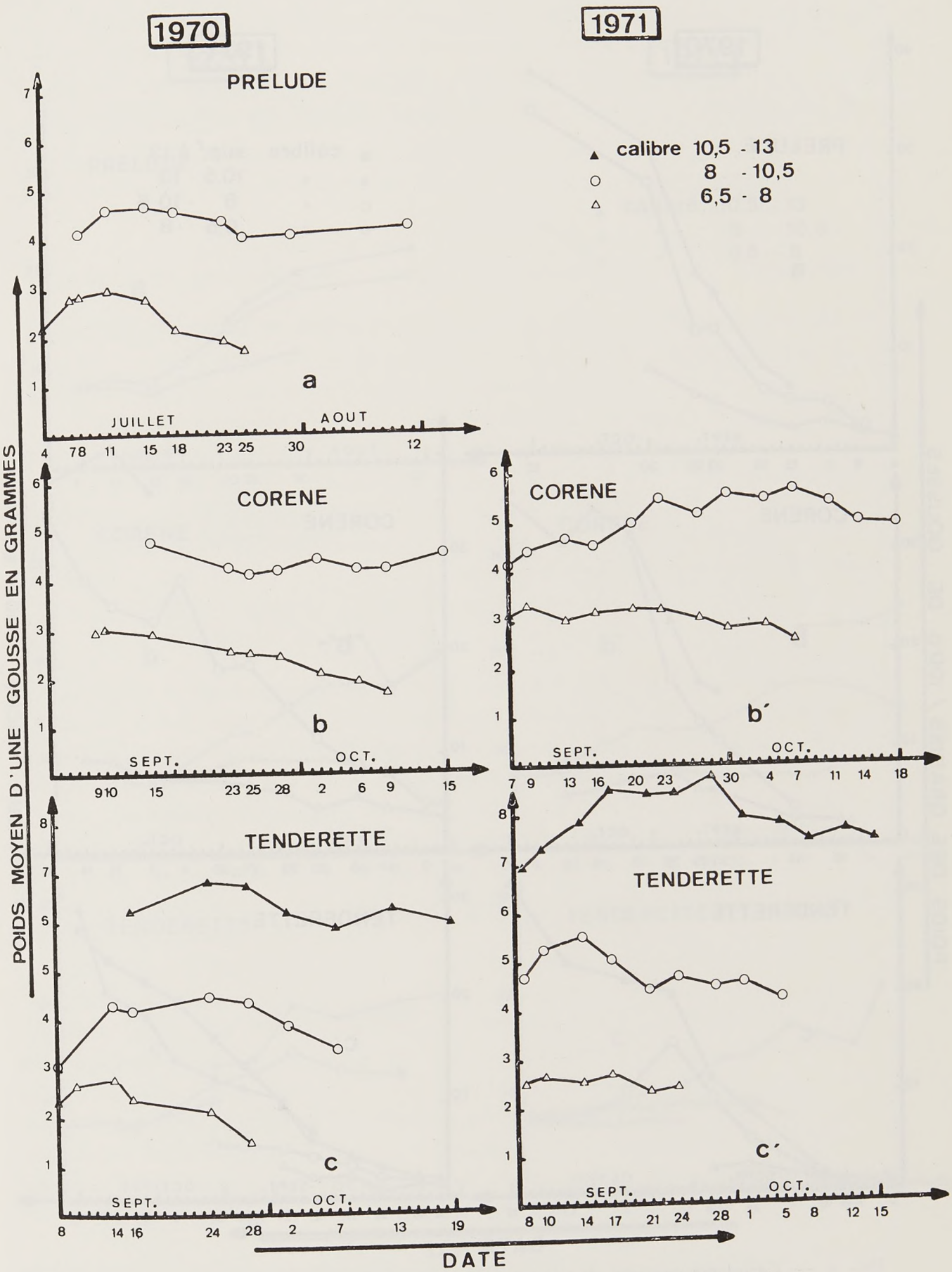


FIG. 1. — *Évolution au cours du temps du poids moyen des fruits correspondant à des classes de calibres différents des trois variétés de haricots verts mange-tout étudiées*
(résultats de 2 années consécutives d'essais)

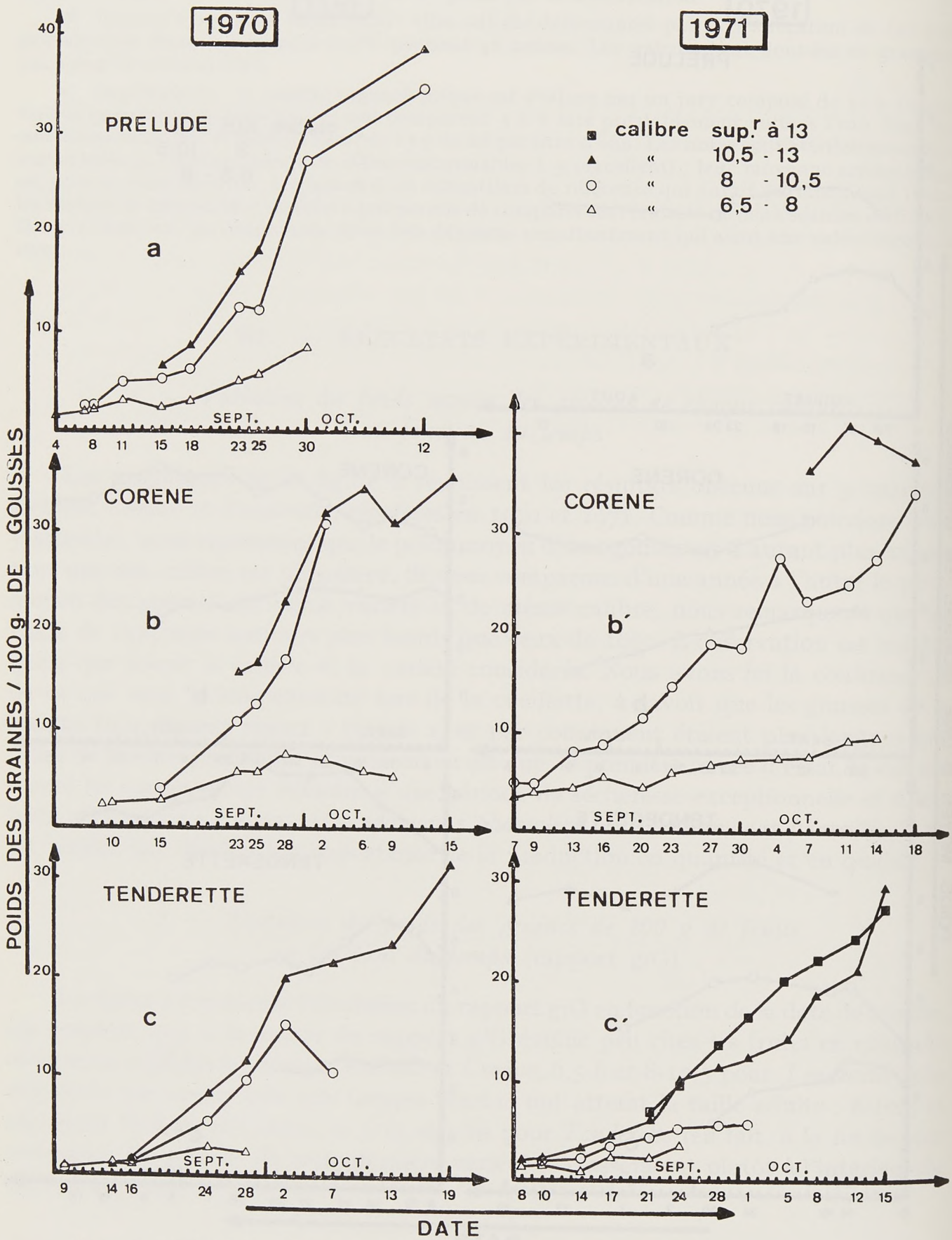


FIG. 2. — *Variations en cours de végétation du taux de graines des fruits* (rapport g/G) *de chacune des classes de calibres des trois variétés de haricots étudiées*

(essais de 1970 et 1971)

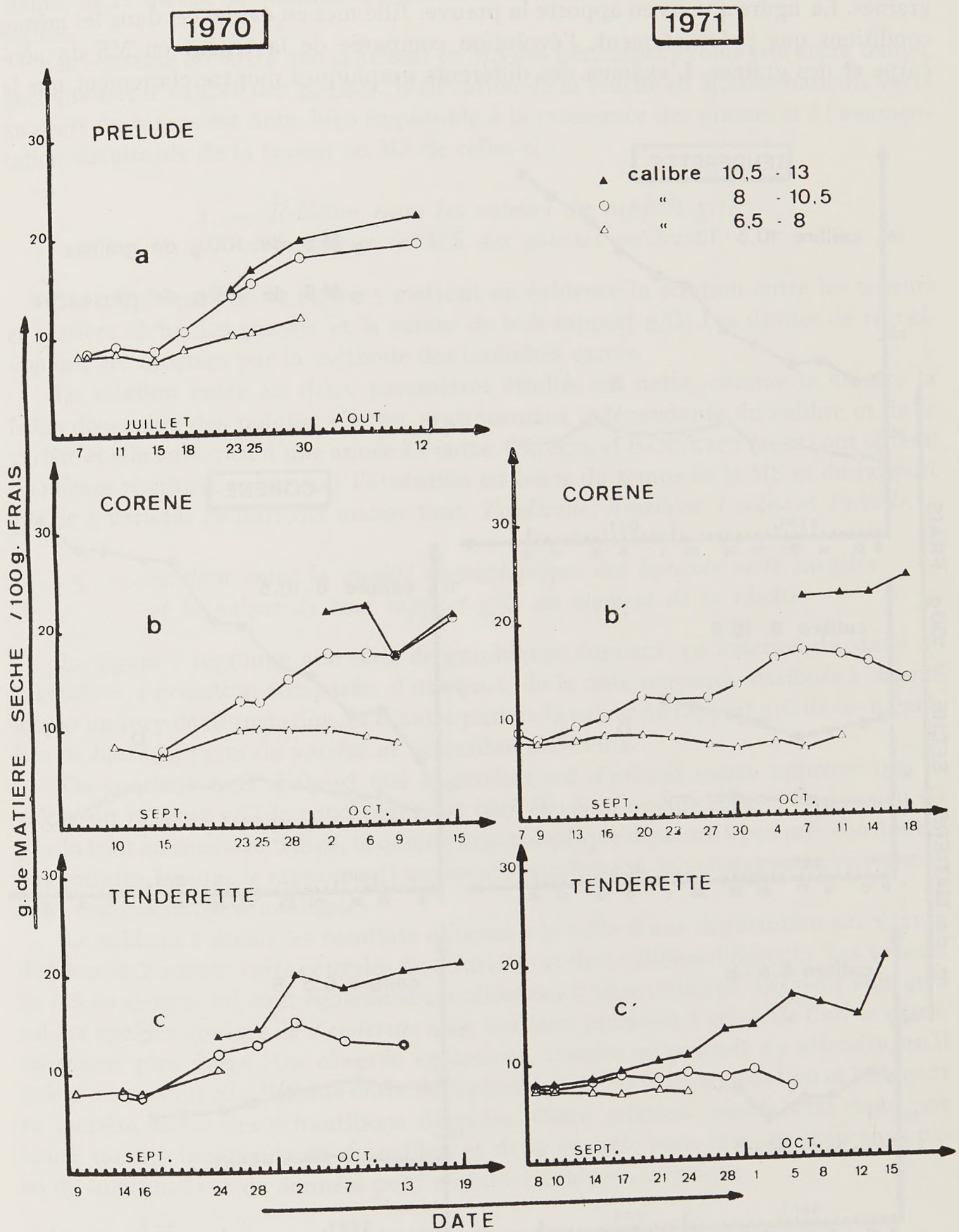


FIG. 3. — *Variations en fonction de la date de récolte des teneurs en MS des fruits des trois variétés de haricots étudiées*
(3 classes de calibres, 2 années consécutives d'essais)

On peut donc se demander si l'accroissement rapide de la teneur en MS des gousses les plus grosses n'est pas imputable avant tout au développement accéléré de leurs graines. La figure 4 nous en apporte la preuve. Elle met en évidence, dans les mêmes conditions que précédemment, l'évolution comparée de la teneur en MS du péricarpe et des graines. L'examen des différents graphiques montre clairement que la

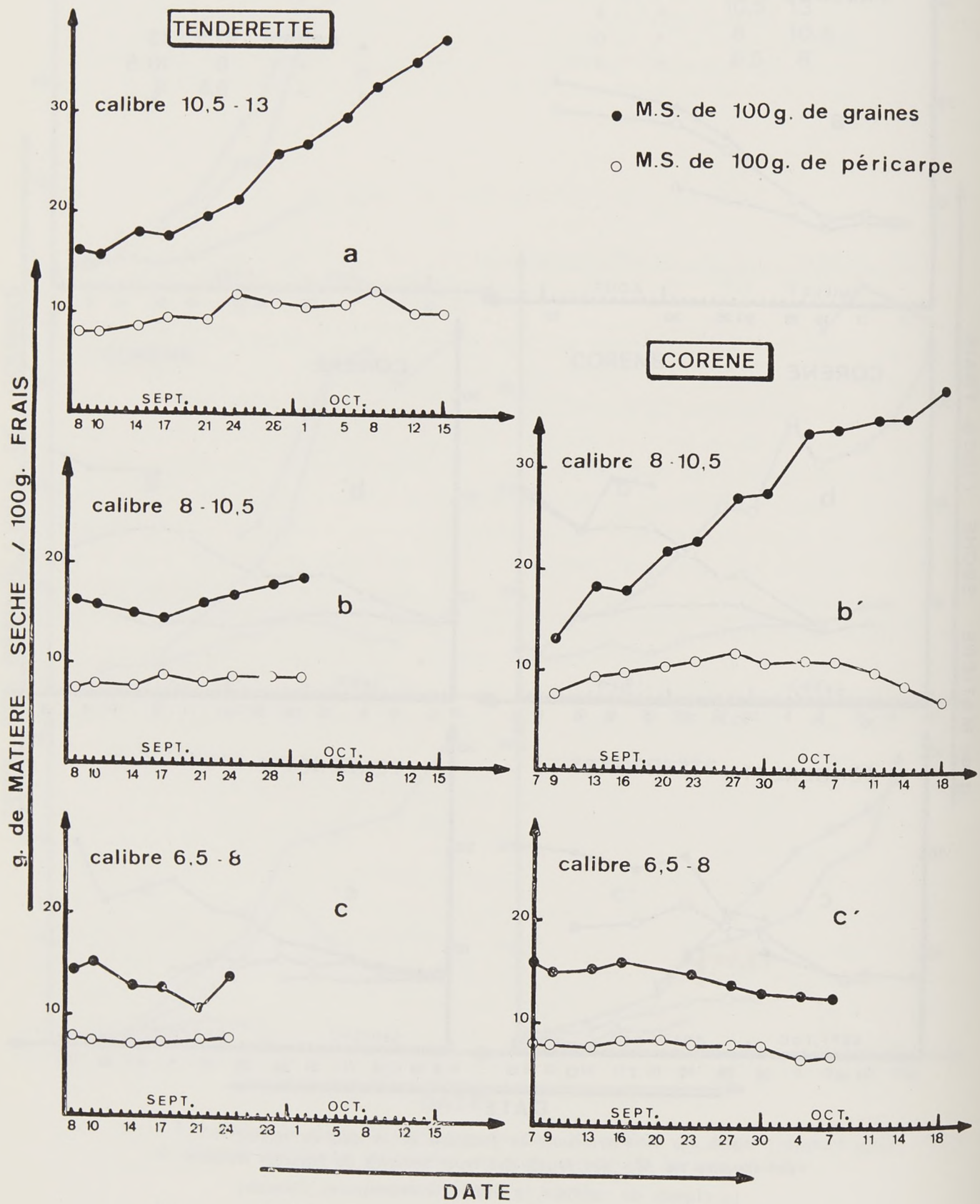


FIG. 4. — *Évolution au cours du temps des teneurs en MS du péricarpe et des graines des fruits représentatifs de chacune des classes de calibres choisies des deux variétés étudiées*

teneur en MS des graines croît très rapidement lorsque les gousses atteignent la taille adulte, alors qu'elle se maintient sensiblement constante dans les gousses les plus petites.

On constate en outre que la teneur en MS des péricarpes évolue peu entre temps, quel que soit le calibre des gousses. L'élévation de la teneur en MS des haricots verts au cours du temps est donc bien imputable à la croissance des graines et à l'augmentation simultanée de la teneur en MS de celles-ci.

4. — *Relation entre les valeurs du rapport g/G et la teneur en MS des gousses entières*

Les graphiques de la figure 5 mettent en évidence la relation entre les teneurs en matière sèche des gousses et la valeur de leur rapport g/G. Les droites de régression ont été ajustées par la méthode des moindres carrés.

La relation entre les deux paramètres étudiés est nette, comme le montre la faible dispersion des points ; elle est pratiquement indépendante du calibre et de la variété et elle varie peu d'une année à l'autre. Olivier et Bannerot (1971) ont obtenu les mêmes résultats en suivant l'évolution au cours du temps de la MS et du rapport g/G de 4 variétés de haricots mange-tout, *Tenderette*, *Améthyst*, *Corène* et *Prélude*.

5. — *Relation entre la qualité organoleptique des haricots verts surgelés et la valeur de leur rapport g/G au moment de la récolte*

La figure 6 regroupe une série de graphiques donnant, en fonction du stade de végétation, l'évolution comparée, d'une part, de la note moyenne attribuée à chaque lot par un jury de dégustation, et d'autre part de la valeur du rapport g/G de ces mêmes lots de haricots verts de variété et de calibre différents.

On constate tout d'abord que le produit est d'autant moins apprécié que la valeur du rapport g/G le concernant est plus élevée. Lorsque celle-ci évolue peu ou pas du tout au cours du temps, la qualité organoleptique demeure à peu près constante ; au contraire, lorsque le rapport g/G augmente rapidement, la valeur gustative régresse dans des proportions analogues.

Le tableau 1 donne les résultats obtenus à la suite d'une dégustation simultanée de 6 lots de haricots verts congelés de 2 variétés et de 3 calibres différents. Les teneurs en MS de chaque lot sont également mentionnées à titre indicatif. On peut voir qu'à calibre égal les gousses de *Tenderette* sont toujours préférées à celles de *Corène* nécessairement plus âgées. On observe également, comme on pouvait s'y attendre, qu'il existe un certain parallélisme entre l'appréciation du jury de dégustation et la teneur en matière sèche des échantillons dégustés. Cette relation semble être dans une bonne mesure indépendante du calibre et de la variété, mais nous ne disposons pas ici de suffisamment de données pour en faire l'analyse statistique.

6. — *Évolution simultanée de la teneur en MS, du rapport g/G et du rendement pondéral de la production au cours du temps*

La figure 7 présente, pour les deux variétés étudiées, un histogramme illustrant l'évolution dans le temps de la masse de production par classe de calibre. Les courbes représentatives de la variation de la teneur en MS et du rapport g/G des haricots

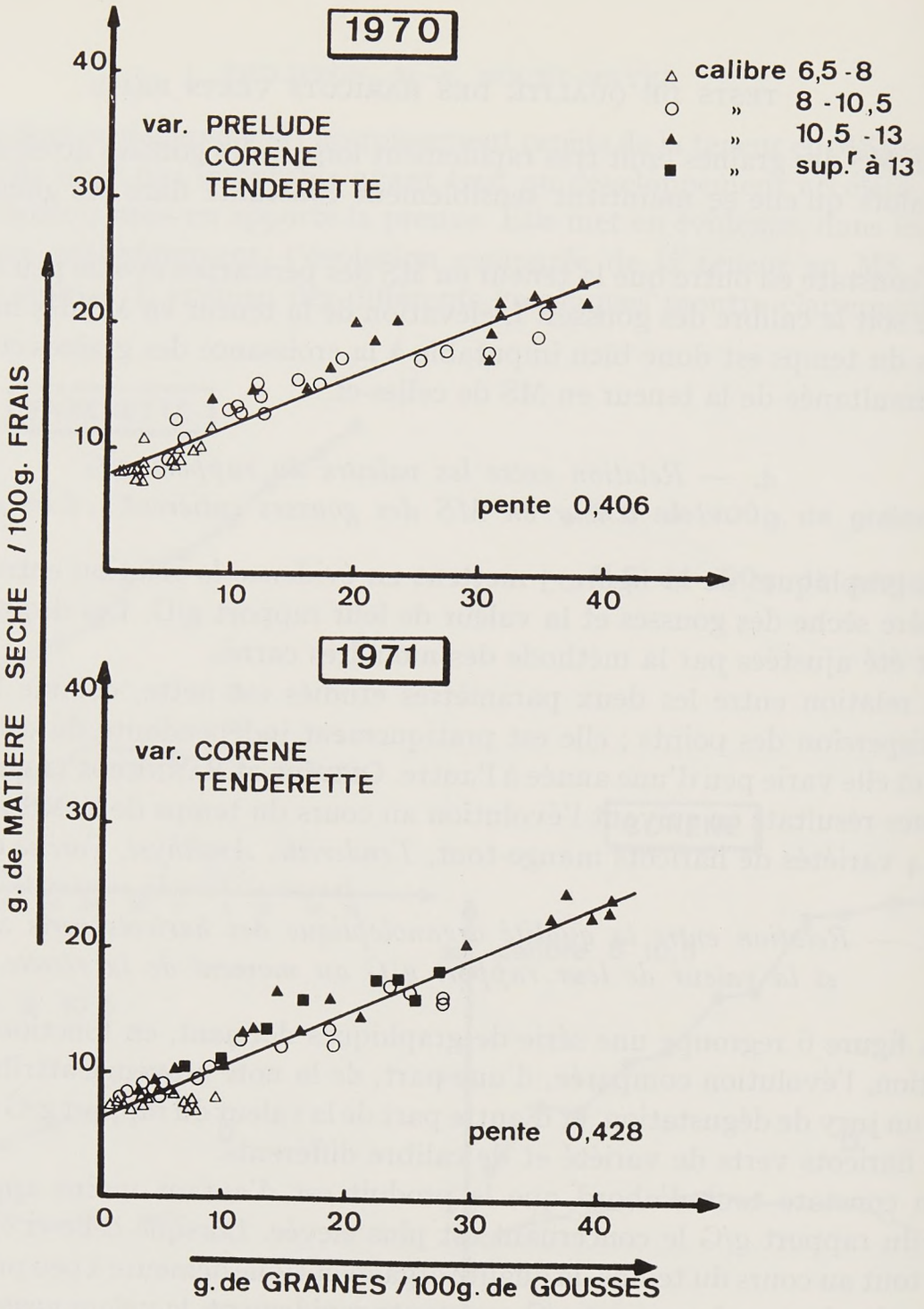


FIG. 5. — *Relation entre la teneur en MS des haricots verts et la valeur de leur rapport g/G* (variétés et calibres confondus ; deux années d'essais)

TABLEAU I. — *Étude comparée de la qualité organoleptique de lots de différents calibres de haricots verts congelés* (variétés *Tenderette* et *Corène*)
Les teneurs en MS de chaque lot sont données à titre indicatif

Classement (dégustation)	Variété	Calibre	Note de dégustation	Matière sèche des gousses (p. 100)
1er	*Corène*	5-6,5	4,18	7,90
1er	*Tenderette*	6,5-8	4,06	7,25
3e	*Tenderette*	8-10,5	3,68	8,39
3e	—	10,5-13	3,56	8,50
5e	*Corène*	8-10,5	3,28	9,50
5e	—	6,5-8	3,25	8,15

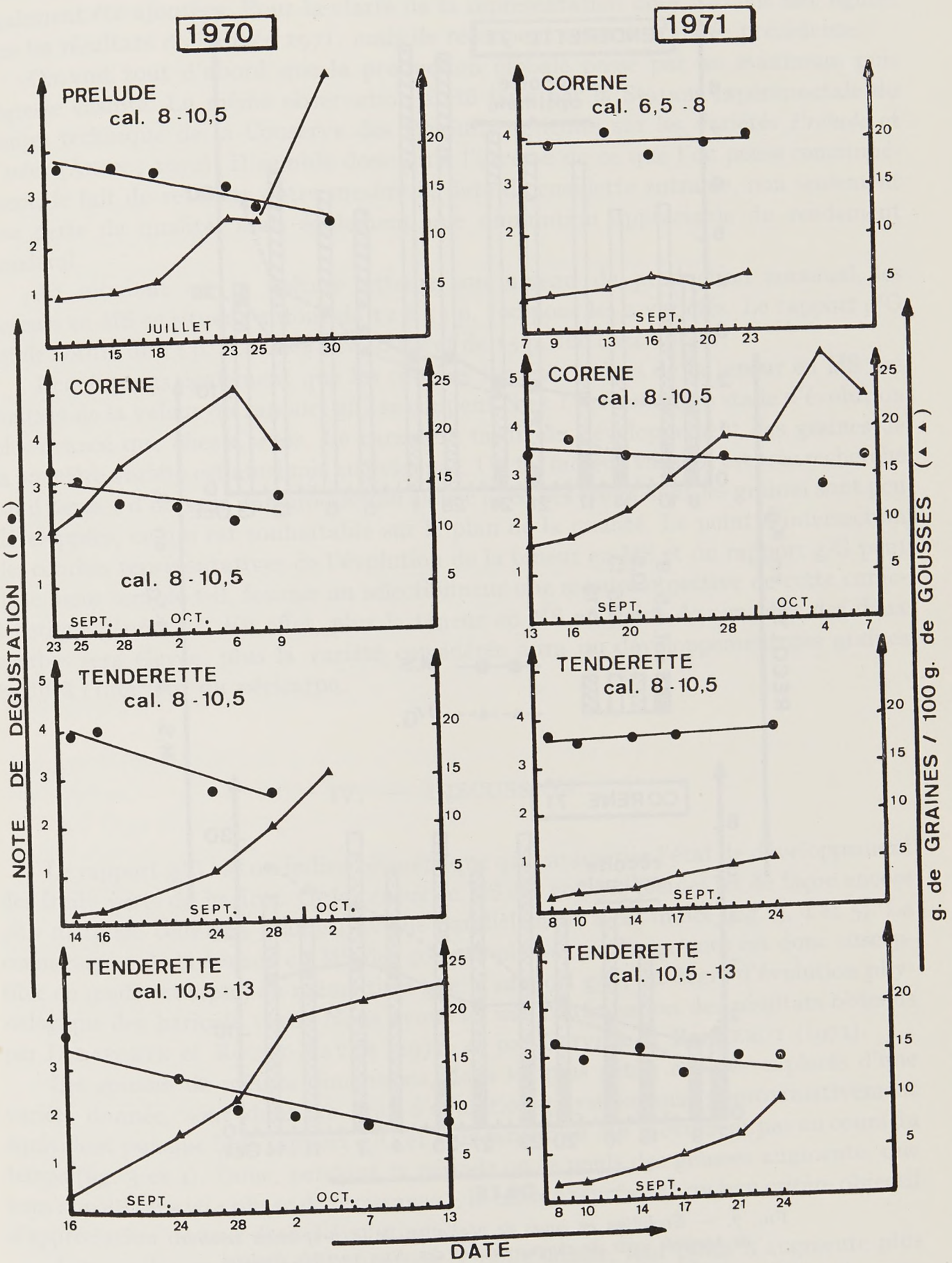


FIG. 6. — *Évolution comparée, au cours du temps, de la qualité organoleptique et du rapport g/G des fruits de différents calibres des trois variétés de haricots étudiées* (essais de 1970 et 1971)

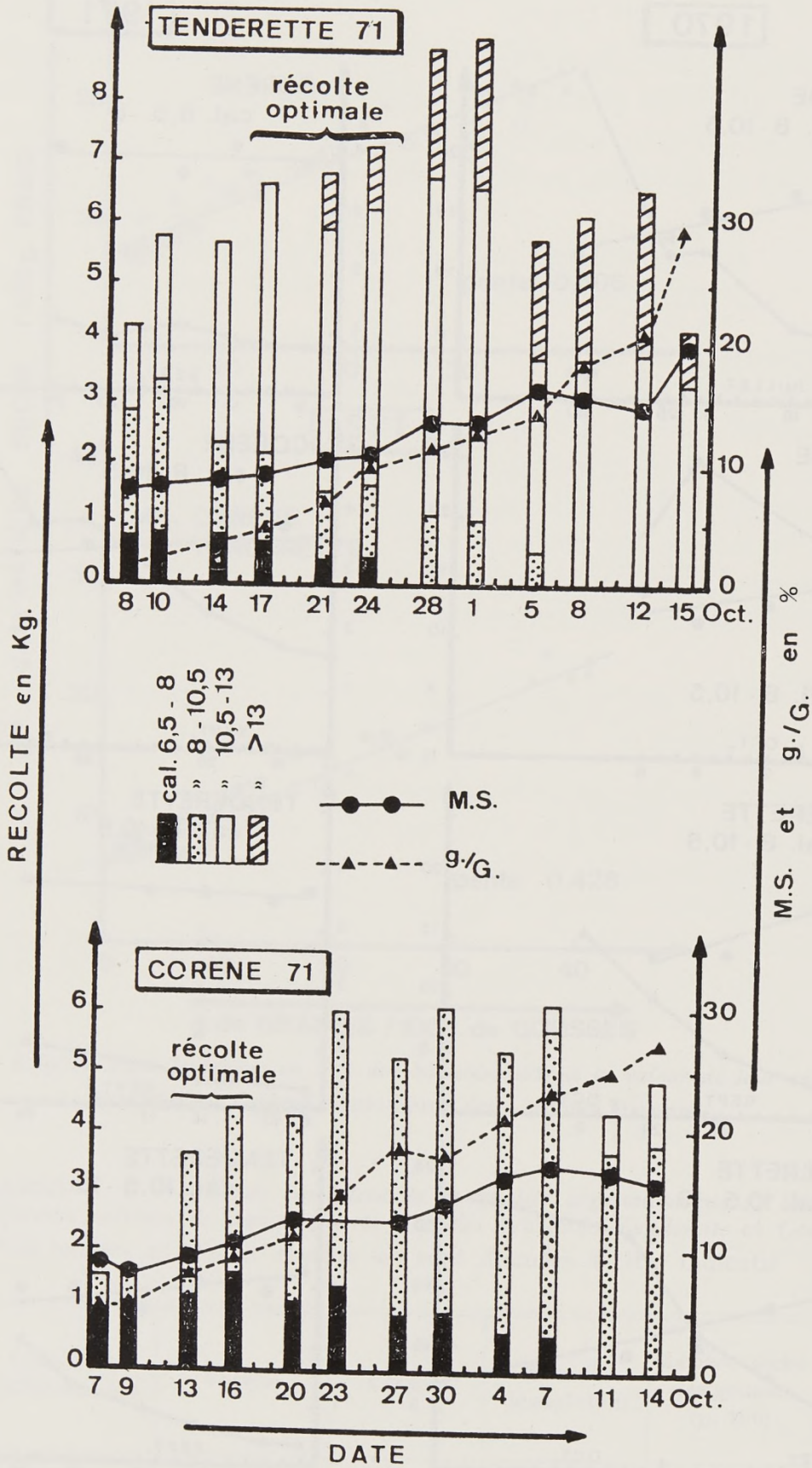


FIG. 7. — *Évolution en cours de végétation de la proportion relative de haricots verts de chaque calibre des deux variétés étudiées*

Les courbes représentatives des teneurs en MS et du rapport g/G du calibre dominant de chaque variété sont également représentées (cal. 8-10,5 pour *Corène* et 10,5-13 pour *Tenderette*)

de la classe de calibre dominant (8-10,5 pour *Corène* et 10,5-13 pour *Tenderette*) ont également été ajoutées. Pour la clarté de la représentation nous n'avons fait figurer que les résultats de l'année 1971, mais ils recoupent ceux de l'année précédente.

On voit tout d'abord que la production globale passe par un maximum puis régresse ensuite. La même observation a été faite par la Station expérimentale du Centre technique de la Conserve des Produits agricoles sur les variétés *Prélude* et *Corène* (ANON., 1972). Il semble donc qu'à l'inverse de ce que l'on pense communément, le fait de retarder outre mesure la date de cueillette entraîne, non seulement une perte de qualité, mais également une diminution appréciable du rendement pondéral.

Au moment où la culture atteint son niveau de production maximal, les teneurs en MS se situent autour de 12 à 13 p. 100 pour les 2 variétés. Le rapport g/G est de l'ordre de 13 p. 100 chez *Tenderette* et de 15 p. 100 chez *Corène*.

Remarquons également que les courbes représentatives de la teneur en MS des fruits et de la valeur du rapport g/G se coupent chez *Tenderette* à un stade d'évolution plus avancé que chez *Corène*. Le caractère tardif du développement des graines de la première variété est ainsi mis en évidence. Un tel facteur variétal est très recherché car il permet d'obtenir une production élevée avec des fruits dont les graines sont peu développées, ce qui est souhaitable sur le plan de la qualité. Le point d'intersection des courbes représentatives de l'évolution de la teneur en MS et du rapport g/G peut donc, nous semble-t-il, fournir au sélectionneur une mesure objective de cette caractéristique génétique. En effet, plus la teneur en MS au point de concours des deux courbes sera élevée, plus la variété considérée aura un développement des graines tardif à l'intérieur du péricarpe.

IV. — DISCUSSION

Le rapport g/G est un indice biométrique qui caractérise l'état de développement des fruits verts du haricot. Or la teneur en MS des gousses pleines (et de façon encore plus marquée celle des graines) évolue parallèlement à cet indice (fig. 3, 4 et 5). La connaissance de la teneur en MS des gousses pleines ou des graines est donc susceptible de rendre compte, au même titre que le rapport g/G, du degré d'évolution physiologique des haricots verts. Nous avons ici une confirmation des résultats obtenus par DELAPORTE et ROUET-MAYER (1971) et par OLIVIER et BANNEROT (1971).

Les gousses de mêmes dimensions, dans les plus petits calibres explorés d'une variété donnée, sont dans un état d'évolution physiologique approximativement équivalent puisque leur rapport g/G et leur teneur en MS n'évoluent pas au cours du temps (fig. 3 et 4). Donc, pendant la période où le poids des gousses augmente, que nous appellerons ici « phase de croissance », le calibre représente un bon critère objectif d'appréciation de leur état d'évolution.

Lorsque les gousses approchent de la taille adulte, leur poids n'augmente plus mais leur teneur en MS et leur rapport g/G s'élèvent rapidement. Au cours de cette deuxième période, que nous appellerons « phase de développement », ces deux paramètres représentent alors les meilleurs repères mesurables du degré d'évolution physiologique des gousses.

Enfin, nous avons vu que la valeur gustative des haricots verts congelés était étroitement conditionnée par l'état de développement des graines du matériel végétal utilisé.

Avant de tirer des conséquences pratiques de ces résultats sur le plan technologique, il convient de se rappeler :

a) que les haricots verts sont récoltés au moment où la plus grande partie de leur production est constituée de gousses ayant atteint la taille adulte ;

b) qu'il existe d'importantes différences variétales quant à la taille des gousses adultes. Il est évident dans ces conditions qu'à calibre égal les variétés à grosses gousses comme *Tenderette* seront moins développées, donc plus appréciées, que les variétés à petites gousses comme *Corène*. C'est pourquoi, en dernière analyse, le rapport g/G ou la teneur en MS des gousses pleines nous paraissent être les critères les plus aptes à rendre compte objectivement du niveau de qualité des haricots verts au moment de leur récolte. Il nous paraît donc souhaitable, en accord avec les auteurs déjà cités, qu'ils se substituent à la notion de calibre pour la détermination de la valeur marchande de la récolte.

Lorsque ces points sont admis, il reste encore à définir à quels niveaux se situent les teneurs en MS et la valeur du rapport g/G au moment de la date optimale de récolte.

Il s'agit en effet de concilier ici deux impératifs contradictoires. On recherche d'une part un produit présentant la meilleure valeur gustative possible, ce qui implique de cueillir des gousses très jeunes, et, d'autre part, on veut une production à l'hectare importante pour des raisons économiques évidentes, ce qui exige de n'effectuer la récolte que lorsque les gousses sont parvenues à un degré de développement déjà avancé.

Si l'on admet que la teneur en MS des haricots verts à la récolte ne doit pas excéder 10 p. 100 et que le rapport g/G doit être inférieur à cette valeur, on constate que, dans le cas de nos essais, la période de récolte optimale se situe entre le 13 et le 16 septembre pour la variété *Corène* et entre le 17 et le 24 septembre pour *Tenderette* (fig. 7).

A ce moment-là, nous voyons que, comparativement à *Corène*, *Tenderette* a une période de récolte optimale plus longue (7 jours contre 3), une production sensiblement plus élevée (8,8 à 9 kg contre 6 à 6,2 kg) et un rapport g/G nettement plus faible (3 à 4 p. 100 contre 8 à 9 p. 100).

Il en ressort que, dans les conditions de nos essais, la variété *Tenderette* s'est révélée bien mieux adaptée que *Corène* à la congélation.

Reçu pour publication en août 1974.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique très active de Mlle C. Mayer, technicienne biochimiste au C. N. R. S. Nous l'en remercions vivement.

M. H. Bannerot, Directeur de la Station d'Amélioration des Plantes du C. N. R. A. de Versailles et M. J.-P. Olivier, Ingénieur à l'I. N. R. A., ont bien voulu accepter de nous fournir la semence et de faire produire sur leurs terrains d'expérimentation le matériel végétal nécessaire à nos essais. Nous leur adressons nos remerciements les plus vifs et les plus sincères.

SUMMARY

PHYSIOLOGICAL STAGE OF DEVELOPMENT OF FRENCH BEANS AT HARVEST TIME AND QUALITY OF THE DEEP-FROZEN PRODUCE. I. — OBJECTIVE QUALITY TESTS OF FRESH FRENCH BEANS INTENDED FOR FREEZING

The aims of this research are :

a) to find the best objective indicators of the quality of fresh french beans ;
b) to analyse the influence of the pod physiological stage of development at harvest time on the quality of the deep-frozen produce ;
c) to define, from the objective data thus obtained, the optimum stage of harvesting.

After a bibliographical examination of the works already published, a series of systematic trials was conducted, for two years in succession, on several classes of calibre of three french bean varieties : *Tenderette*, *Corene* and *Prelude*.

The main results obtained show that :

1. If calibre constitutes a good criterium of quality for growing fruits, it is no longer valid when the latter reach adult size. The dry matter content or the weight of seeds/weight of full pods (s/p) ratio then constitute the best parameters.

2. The intersection point of curves representing development, in course of time, of the dry matter and s/p ratio provides a means of objective measurement of the varietal characteristic responsible for the more or less late seed development in the fruits.

3. The weighable yield of the total pod harvest reaches a peak, in course of time, then tends to diminish.

4. For each of the points studied, *Tenderette* variety proved superior to *Corene* for deep-freezing.

RESUMEN

ETAPA DE DESARROLLO FISIOLOGICO DE LAS HABICHUELAS VERDES EN LA COSECHA Y CALIDAD DEL PRODUCTO CONGELADO FINAL. I. — EXPERIMENTACIONES OBJETIVAS DE LA CALIDAD DE LAS HABICHUELAS VERDES FRESCAS CON DESTINO A LA CONGELACION

Este estudio persigue los siguientes objetivos :

a) tratar de encontrar las mejores referencias objetivas en relación con la calidad de las habichuelas verdes frescas ;
b) analizar la incidencia de la etapa de evolución fisiológica de las vainas en el momento de la cosecha sobre la calidad del producto congelado final ;
c) definir, tomando como punto de partida los datos objetivos así recogidos, la etapa óptima para la cosecha.

Tras un estudio bibliográfico de los trabajos ya publicados, se ha llevado a cabo durante dos años consecutivos, una serie de ensayos sistemáticos relativos a diversas clases de calibre de tres variedades de habichuelas verdes crecidas : *Tenderette*, *Corene* y *Prelude*.

Los principales resultados obtenidos demuestran que :

1º Si bien el calibre constituye un criterio correcto de calidad para los frutos durante el transcurso del crecimiento, este parámetro deja de ser valedero cuando éstos hand alcanzado la talla adulta. El contenido de materias secas o la relación peso de los granos/peso de las vainas llenas (g/G) constituyen entonces los mejores parámetros de apreciación.

2º El punto de intersección de las curvas representivas de la evolución, durante el transcurso del tiempo, de las materias secas y de la relación g/G, proporciona un medio de apreciación objetivo del carácter varietal responsable del desarrollo de los granos, más o menos tardío en los frutos.

3º El rendimiento en peso de la cosecha total de las vainas pasa, durante el transcurso del tiempo, por un máximo, que acusa acto seguido cierta regresión.

4º En cada uno de los punto estudiados, la variedad *Tenderette* ha demostrado ser superior a la variedad *Corene* por lo que se refiere a la congelación.

RIASSUNTO

STADIO DI SVILUPPO FISIOLOGICO DEI FAGIOLINI ALLA RACCOLTA E QUALITA' DEL PRODOTTO SURGELATO FINITO. I. — PROVE OBIETTIVE DELLA QUALITA' DEI FAGIOLINI FRESCHI DESTINATI AL CONGELAMENTO

Questo studio si propone di :

a) ricercare i migliori criteri obiettivi della qualità dei fagiolini freschi ;
b) analizzare l'incidenza dello stadio d'evoluzione fisiologico dei baccelli alla raccolta sulla qualità del prodotto surgelato finito ;
c) definire, a partire dai dati obiettivi cosí raccolti, lo stadio di raccolta ottimo.

Dopo uno studio bibliografico dei lavori già pubblicati, è stata intrapresa durante due anni consecutivi, una serie di prove sistematiche che avevano come oggetto diverse classi di calibro di 3 varietà di fagiolini mangiatutto : *Tenderette, Corene, Prelude.*

I principali risultati ottenuti mostrano che :

1. Se il calibro costituisce un buon criterio di qualità per dei frutti in fase di crescita, esso non è più valido quando questi frutti hanno raggiunto la talgia adulta. Il tenore di materia secca o il rapporto peso dei semi/peso dei baccelli pieni (g/G) costituiscono allora i migliori parametri.

2. Il punto d'intersezione delle curve rappresentative del l'evoluzione, nel tempo, delle materie secche e del rapporto g/G, dà un mezzo di misura obiettivo del carattere della varietà responsabile dello sviluppo dei semi più o meno tardivo nei frutti.

3. Il rendimento di peso della raccolta totale dei baccelli passa nel tempo per un punto massimo poi tende a diminuire.

4. Per quanto riguarda il congelamento, la varietà *Tenderette* si è rivelata superiore su ciascun punto studiaot.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anon., 1972. Étude de la qualité de haricots mange-tout appertisés et surgelés en fonction de critères mesurés à la récolte. *Compte Rendu d'Essais de la Station expérimentale du Centre technique de la Conserve des Produits agricoles*, 1er semestre 1972. Avenue Paul Claudel, 80 Dury-les-Amiens, 1 br., 63 p.

Arthey V. D., Webb C., 1967. Maturity in relation to the quality of quick frozen dwarf beans. *Tech. Memo. Fruit Veg. Cann. quick Freeze Res. Ass.* (80).

Board P. W., Coote G. G., 1959. The maturation of green stringless bush beans. *Tech. Pap. Div. Food Preserv. Transp. C. S. I. R. O. Aust.* (12).

Bolly L., Biston R., Degendesch-Berteaux C., 1967. Incidence de la maturité sur la qualité des conserves de haricots. I. Caractères de qualité influencés par la maturité. *Bull. I. N. A. C. O. L.*, **18** (9), 332-353.

Carr D. J., Skene K. G. M., 1961. Diauxic growth curves of seeds with special reference to french beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Aust. J. Biol. Sci.*, **14** (1), 1-12.

Culpepper C. W., 1936. Effect of stage of maturity of the snap bean on its composition and use as a food product. *Food. Res.*, **1**, 357-376.

Delaporte N., Rouet-Mayer M.-A., 1971. Évolution des teneurs en chlorophylles *a* et *b* et en acide ascorbique des gousses de haricots au cours de leur croissance. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **4** (2), 46-49.

FARKAS D. F., 1967. Use of seed size for controlling snap bean quality for processing. *Food Technol.*, **21**, 789-791.

FOX M., KRAMER A., 1966. Objective tests for determining quality of fresh green beans. *Food Technol.*, **20** (12), 1594-1598.

GARDINER K. D., 1970. Alcohol insoluble solids and dry matter content in the assessment of quality and maturity in french beans. *J. Hort. Sci.*, **45**, 163-174.

GARDINER K. D., PRENDIVILLE M. D., 1970. Seed percentage, seed length and shear press values in the evaluation of quality and maturity in french beans. *J. Horti. Sci.*, **45**, 303-314.

GUYER R. B., KRAMER A., 1952. Studies of factors affecting the quality of green and wax beans. *Maryland Univ. agric. exp. Sta.*, Bull. A-68.

GOULD W. A., 1951. Quality evaluation of fresh, frozen and canned snap beans. *Res. Bull. Ohio agric. exp. Sta.*, (701).

HOW J., HEYDECKER W., 1967-1968. When to harvest dwarf beans. *Rep. Sch. agric. Univ. Nottingham*, 68-72.

JONES L. H., CORNER J. J., 1962. Physiological aspects of dwarf bean maturity. *Proc. first int. Congr. Food Sci. Technol.*, **2**, 137-147.

OLIVIER J.-P., BANNEROT H., 1971. Étude comparative de l'évolution des gousses de même âge pour 4 variétés de haricots mange-tout. *Rev. gén. Froid*, (6), 527-535.

POLESELLO A., CRIVELLI G., LOCATELLI A., 1972. Primi rilievi sugli indici di raccolta del fagiolino per la surgelazione. *Ind. agrar.*, **10** (3), 127-132.

ROBINSON W. B. *et al.*, 1964. Quality versus yield of snap beans for processing. *Proc. americ. Soc. Hort. Sci.*, **84**, 339-347.

ROWE S. C., BONNEY V. B., 1936. A study of chemical and physical methods for determining the maturity of canned snap beans. *J. Assoc. offic. agric. Chemists*, **19**, 620.

WEBB C., 1969. Maturity in relation to the quality of quick frozen dwarf beans : 1967 trial. *Tech. Memo., Fruit Veg. Preserv. Res. Ass., Campden*, janv. 1969 (89).

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 451-466.

STADE DE DÉVELOPPEMENT PHYSIOLOGIQUE DES HARICOTS VERTS A LA RÉCOLTE ET QUALITÉ DU PRODUIT SURGELÉ FINI

II. — Évolution des teneurs en matière sèche, en acide ascorbique et en chlorophylles *a* et *b*, dans le péricarpe et les graines de haricots verts en cours de végétation

M.-A. ROUET-MAYER et J. PHILIPPON

Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux,
Station du Froid du C. N. R. S.,
4 ter, route des Gardes,
92190 Meudon

RÉSUMÉ

Les buts recherchés sont :

1° d'étudier les transferts de masse éventuels à l'intérieur des fruits pendant leur croissance et leur développement ;

2° de mieux connaître l'incidence de la date de récolte sur la richesse des gousses en chlorophylles et en acide ascorbique (AA), l'évaluation des teneurs résiduelles en ces deux composés étant communément prise en considération pour contrôler la qualité des haricots surgelés.

Deux années consécutives d'essais effectués sur trois variétés de haricots mange-tout ont permis de mettre en évidence les points suivants :

a) au cours du développement des haricots, les quantités de matière sèche (MS) qui s'accumulent dans le péricarpe passent par un maximum puis régressent lorsque le poids sec des graines se met à augmenter plus rapidement que leur poids frais ;

b) les teneurs en AA des fruits du haricot, rapportées aux MS, évoluent peu dans la gousse adulte. Ce résultat masque en fait un enrichissement progressif du péricarpe et un appauvrissement concomitant des graines ;

c) les teneurs en chlorophylles totales des fruits entiers, rapportées à la MS, régressent rapidement au voisinage de la date optimale de récolte. On observe jusqu'à 25 p. 100 de pertes lorsque les teneurs en MS des gousses passent de 8,5 à 10 p. 100. Par contre le rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* reste constant quel que soit l'âge des fruits et il diffère très peu d'une variété à l'autre.

Mots clés : *haricot vert, surgélation, croissance, évolution de la composition.*

I. — INTRODUCTION

Dans l'étude précédente (PHILIPPON et ROUET-MAYER, 1974), nous avons vu que le rapport poids des graines/poids du fruit (g/G) et la valeur du taux de MS des fruits du haricot constituent de bons repères objectifs de leur état de développement physiologique.

Nous avons montré en outre que, plus les haricots verts sont à un stade de développement avancé au moment de la récolte, moins le produit congelé est apprécié par les dégustateurs.

Il nous a donc semblé intéressant d'analyser simultanément dans les graines et dans le péricarpe des haricots verts les variations de masse (eau et matière sèche) qui se produisent au cours de la croissance et du développement des fruits à l'approche du stade optimal de récolte.

On sait par ailleurs que la qualité organoleptique des haricots verts surgelés peut être contrôlée par un jury de dégustation, mais cette méthode, en dernier ressort indispensable, est lourde à mettre en œuvre et nécessite à chaque contrôle un personnel nombreux ainsi que d'importantes quantités de matière première. On préfère, chaque fois que cela est possible, recourir à des tests objectifs d'un usage plus commode. Les plus couramment utilisés font appel aux dosages chimiques des teneurs en acide ascorbique et en chlorophylles du matériel végétal. Le premier test revient à évaluer la teneur du produit en un composé particulièrement oxydable ; le second a pour objet de mesurer le degré de conversion des chlorophylles *a*, *b* et totales en pigments vert-brun, les phéophytines. Mais encore convient-il de connaître la richesse initiale de la matière première fraîche en ces deux composants chimiques, ainsi que l'influence des facteurs qui avant récolte sont susceptibles de la faire varier. L'état de développement des fruits représente probablement l'un des plus importants. C'est pourquoi nous nous sommes attachés à étudier les conditions dans lesquelles évoluent les teneurs en acide ascorbique et en chlorophylles des haricots verts pendant la période de végétation qui encadre le stade optimal de cueillette.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ces recherches font suite à l'étude de DELAPORTE et ROUET-MAYER (1971). Elles constituent le complément des travaux présentés dans l'article précédent ; elles ont porté sur les mêmes lots de haricots verts.

Trois variétés *Prélude, Corène, Tenderette,* ont été produites pendant deux années consécutives par la Station centrale d'Amélioration des Plantes de l'I. N. R. A., Versailles. Chacune a été cultivée en deux parcelles distinctes afin d'obtenir une répétition. Les parcelles comportaient 18 rangées d'égale longueur. Lors d'un contrôle, une rangée entière était arrachée puis transportée aussitôt au laboratoire où la totalité de la récolte était détachée des plants, classée par calibre et pesée. Les trois calibres retenus ont été : 6,5-8 ; 8-10,5 et 10,5-13.

Les récoltes ont eu lieu à 72 ou 96 heures d'intervalle à partir du quinzième jour environ qui a suivi la pleine floraison.

Les mesures et les dosages chimiques suivants ont été simultanément effectués : poids moyen des fruits de chaque calibre ; poids moyen des graines d'un fruit ; teneurs en matière sèche du péricarpe, des graines et des fruits entiers ; teneurs en acide ascorbique dans les graines et les gousses pleines ou vides ; teneurs en chlorophylles *a*, *b* et totales.

a) *Poids moyen d'une gousse.* La masse totale de la production de haricots d'un calibre donné a été divisée par le nombre d'individus qui la compose.

b) *Poids moyen des graines d'un fruit.* Il a été calculé en pesant les graines de 80 à 100 fruits de même calibre et en divisant le résultat obtenu par le nombre de gousses.

c) *Teneurs en matière sèche* (MS). Elles ont été déterminées par dessication de 100 g de produit frais dans une étuve à 105°C pendant 48 h. Les valeurs obtenues sont exprimées en g pour 100 g de matière fraîche.

d) *Dosage des chlorophylles.* Les pigments verts de 40 g de haricots ont été extraits par broyage pendant 2 minutes dans un mixer en présence d'une solution froide (— 15°C) à 90 p. 100 d'acétone pure. Le dosage des chlorophylles *a*, *b* et totales a été effectué par spectrophotométrie selon la méthode décrite par DELAPORTE et LAVAL-MARTIN (1971). Celle-ci est basée sur la mesure de la vitesse de transformation des chlorophylles en phéophytines dans des conditions définies.

e) *Dosage de l'acide ascorbique.* L'acide ascorbique a été extrait de 100 g de haricots par broyage au mixer dans 250 ml d'une solution renfermant 2 p. 100 d'acide métaphosphorique et 40 p. 100 de sulfate d'ammonium. Le dosage est effectué par spectrophotométrie dans l'UV suivant la méthode de DELAPORTE (1971). L'absorption de l'extrait est mesurée à 265 nm, avant et après oxydation de l'AA par la polyphénoloxydase en présence de pyrocatéchol.

III. — RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. — *Évolution de l'eau et de la MS dans le péricarpe et dans les graines de fruits de haricots ayant atteint la taille adulte*

Nous avons cherché à analyser les conditions dans lesquelles évoluent simultanément l'eau et la MS dans le péricarpe et dans les graines lorsque les haricots ont atteint la taille adulte (calibre maximal). En effet, ce n'est qu'à partir de ce moment-là que le développement des graines devient très rapide (PHILIPPON et ROUET-MAYER, 1974).

L'étude a été effectuée sur des fruits de calibre 8-10,5 pour *Corène* et 10,5-13 pour *Tenderette* (en fait la taille adulte de cette dernière correspond plutôt au calibre 11,5-14). Les résultats ainsi obtenus sont regroupés sur les 4 graphiques de la figure 1.

Les courbes en traits gras des graphiques de gauche (évolution, en fonction du temps, du poids de la matière sèche contenue dans le péricarpe d'un fruit) montrent clairement que le péricarpe se comporte en organe de réserve ; il accumule dans un premier temps de la matière sèche pour la céder ensuite progressivement.

Les courbes des graphiques de droite mettent en évidence le développement extrêmement rapide des graines, lequel se traduit par une forte augmentation, à la fois, du poids frais et des teneurs en MS.

On remarquera encore que les courbes représentatives de l'évolution du poids frais et du poids sec des graines d'un fruit se superposent pratiquement jusqu'au 24 septembre pour *Tenderette*. Or, c'est à cette date que la quantité de MS accumulée dans le péricarpe est maximale. Par la suite, l'augmentation de la quantité de MS se fait plus rapidement que celle du poids frais.

Pour *Corène*, nous observons le même phénomène, mais la divergence des courbes donnant l'évolution du poids frais et du poids sec des graines a lieu ici 4 jours avant que le péricarpe n'ait atteint son maximum de MS. Ce décalage ne semble pas devoir être significatif, car la différence entre les quantités de MS mesurées le 23 septembre et le 27 septembre est inférieure à la variabilité due à l'échantillonnage.

En fait tout se passe comme si, à partir d'un certain stade d'évolution des fruits, l'accélération du développement des graines avait lieu en partie grâce à la mobilisation

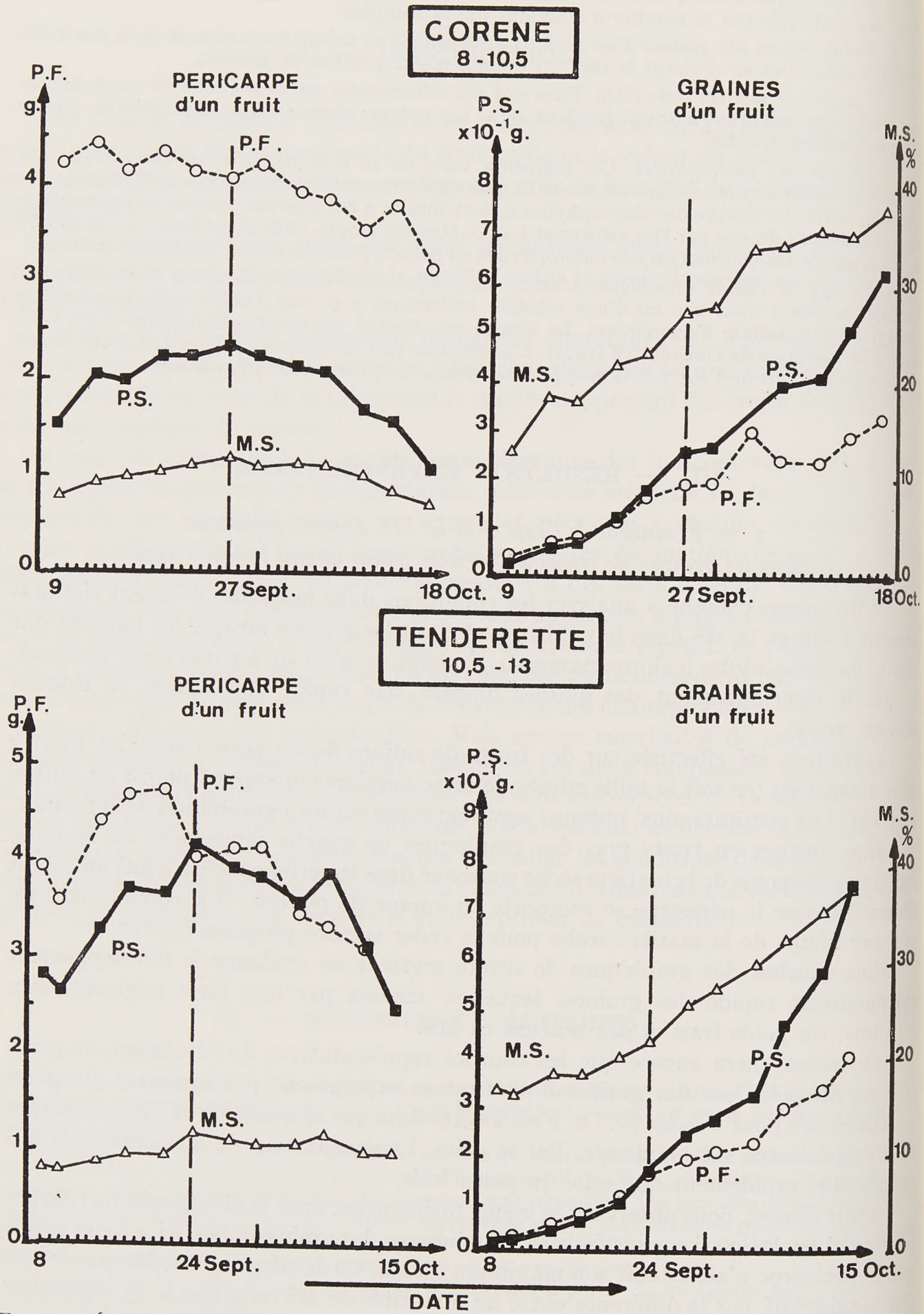


FIG. 1. — *Évolution du poids à l'état frais* (PF) *et du poids de la matière sèche* (PS) *contenue dans le péricarpe et les graines d'un fruit de haricot en fonction de la date de récolte.* La courbe représentative des teneurs en matière sèche (MS) des deux parties du fruit (péricarpe et graines) est également figurée. Deux variétés : *Tenderette* et *Corène.*

des réserves de MS accumulées dans le péricarpe. Il serait néanmoins hasardeux d'en déduire que ce transfert de substance s'effectue directement d'une partie à l'autre du fruit. En effet, nous n'observons ici que la résultante d'un processus physiologique qui est peut-être beaucoup plus complexe.

De tels résultats sont à rapprocher de ceux obtenus par Carr et Skene (1961) et Jones et Corner (1962). Ces auteurs ont étudié l'évolution physiologique des haricots verts à partir de l'anthèse (sur des fleurs repérées). Ils ont distingué 3 phases dans la croissance des fruits ; la première se manifeste par une croissance exponentielle des graines, elle a lieu entre le huitième et le vingtième jour après l'anthèse. Une seconde période de 3 à 4 jours lui succède (phase critique) pendant laquelle l'augmentation du poids sec et du poids frais des graines est fortement ralentie. Dans la troisième période, la vitesse de croissance des graines remonte d'abord brusquement jusqu'au niveau de la première période, puis elle se ralentit ensuite graduellement pour devenir nulle vers le trentième jour après l'anthèse. Dans le même temps, le poids frais du péricarpe croît jusqu'à une valeur maximale qu'il atteint vers le vingtième jour, puis il régresse ensuite rapidement. Les auteurs en concluent que le péricarpe commence alors à se dessécher.

Les résultats que nous obtenons ici indiquent clairement qu'il ne s'agit pas seulement d'une déshydratation, mais également d'une perte de substance sèche. On est donc amené à en déduire que le péricarpe commence à céder ses réserves bien plus tôt qu'on ne l'admettait jusqu'alors, puisque l'on pensait que cette phase débutait avec le commencement de la maturation des gousses (Jones et Corner, 1962).

Il faut également remarquer qu'au cours de la période que nous avons étudiée, et qui s'achève bien avant que les fruits soient parvenus à leur pleine maturité physiologique, le poids frais du péricarpe des fruits de la variété *Tenderette* passe par un maximum avant que la quantité de MS qu'il renferme n'ait atteint son niveau le plus élevé. Pour la variété *Corène*, le poids frais régresse régulièrement dans l'intervalle de temps exploré.

Par ailleurs, nous n'avons pas pu mettre en évidence de période critique dans le développement des graines. Mais ceci s'explique très facilement par le fait que, contrairement aux auteurs cités, nous n'avons pas étudié la croissance sur des individus isolés, mais sur une population moyenne de 80 à 100 fruits qui, bien que de même calibre, n'étaient pas d'un âge identique. Les petits accidents de la courbe de croissance ne peuvent pas dans ces conditions être détectés.

2. — *Évolution des teneurs en acide ascorbique* (AA) *dans les différentes parties de la gousse des haricots verts*

Les graphiques de la figure 2 représentent l'évolution, au cours du temps, de la teneur en AA, exprimée par unité de matière fraîche, dans les fruits verts, les graines et le péricarpe du haricot. Cette étude a été effectuée sur trois calibres de la variété *Tenderette* et sur deux de *Corène*. Nous avons ici été amenés à présenter pour la première fois, séparément, les résultats des deux répétitions, car les différences constatées d'une parcelle à l'autre ont été trop importantes pour qu'on puisse les confondre.

Les résultats obtenus indiquent que la teneur en AA des haricots verts de chaque

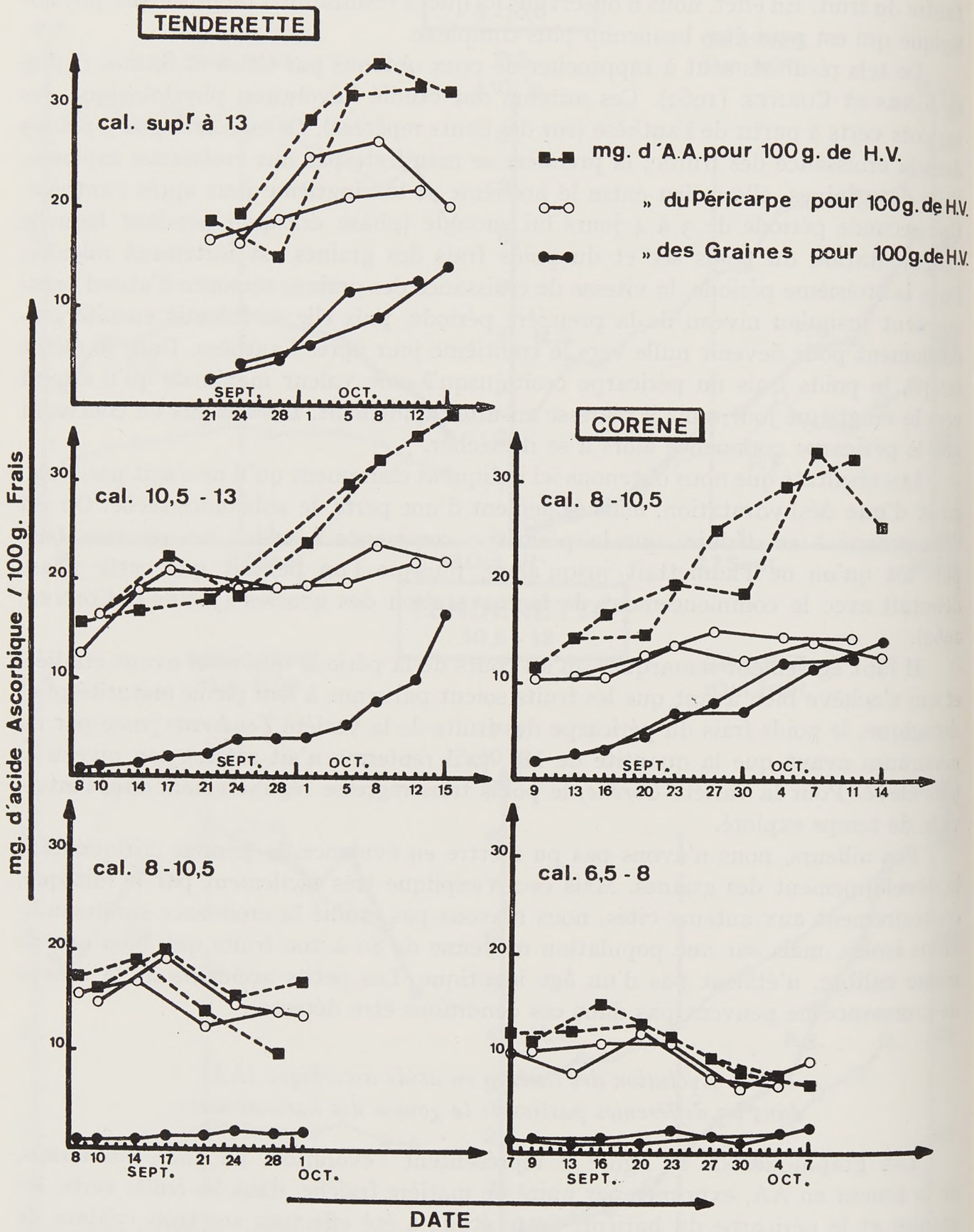


FIG. 2. — *Évolution, en fonction de la date de récolte, des teneurs en acide ascorbique* (AA) *contenues dans les péricarpes, les graines et les gousses entières de 100 g de haricots à l'état frais, deux parcelles, trois classes de calibres pour la variété* Tenderette, *et deux pour* Corène.

variété, exprimée par rapport à 100 g de matière fraîche, reste constante ou tend à régresser dans les gousses entières des calibres les plus petits (8-10,5 pour *Tenderette* et 6,5-8 pour *Corène*), c'est-à-dire dans les gousses dont le rapport g/G ne varie pratiquement pas. Par contre, dans les calibres supérieurs, on observe une augmentation importante au cours du temps de la teneur globale en AA des fruits ; elle est essentiellement due à leurs graines, car dans le péricarpe elle évolue peu.

Les graphiques de la figure 3 expriment les mêmes résultats, mais ici les

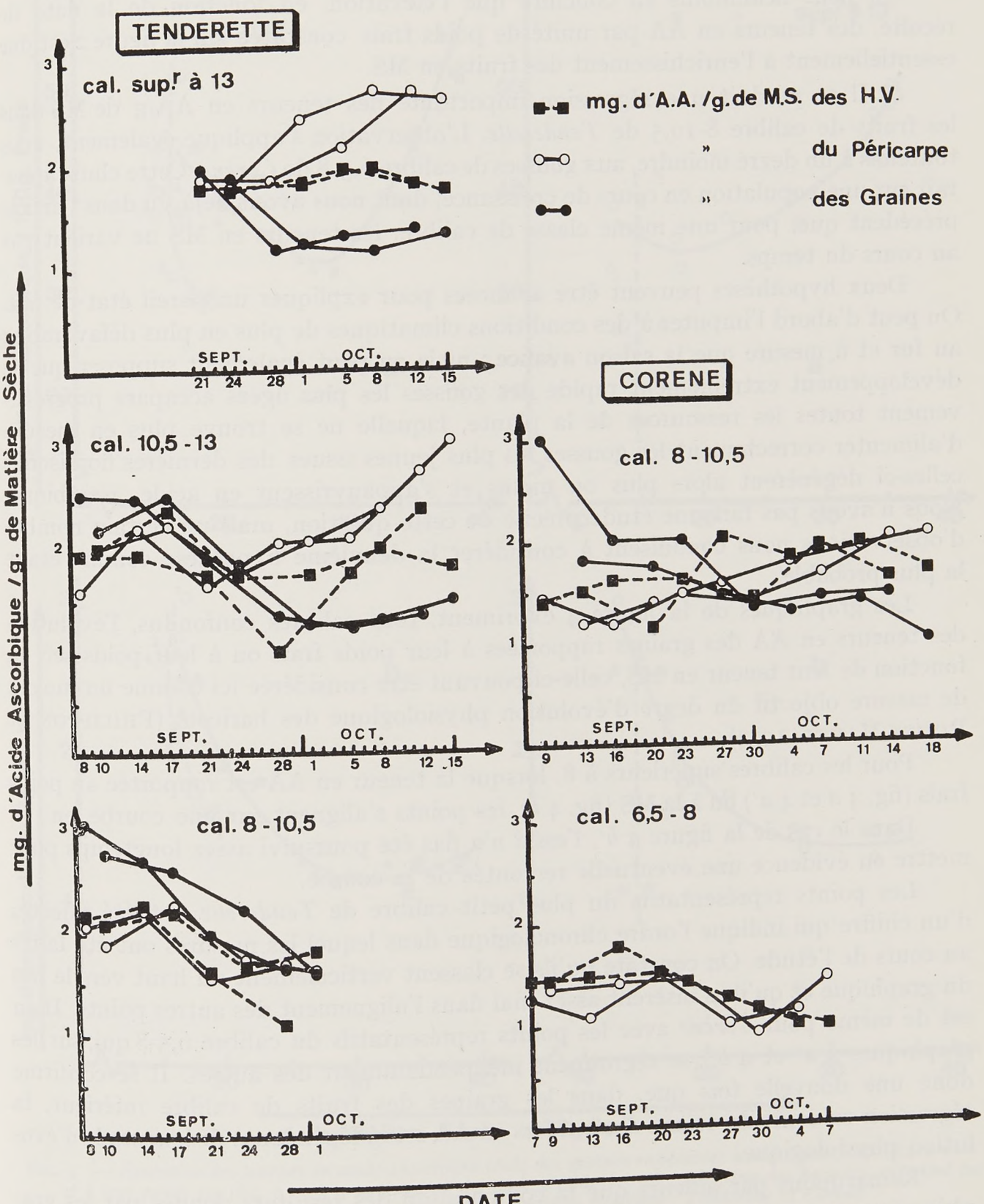


FIG. 3. — *Évolution comparative des teneurs en acide ascorbique* (AA) *contenues dans 1 g de matière sèche* (MS) *de péricarpe, de graines et de fruit entier, en fonction de la date de récolte*

teneurs en AA sont rapportées à la MS. Ils nous conduisent à faire les observations suivantes.

a) La teneur en AA des haricots rapportée à leur MS varie peu au cours du temps pour les fruits de taille adulte (calibre 10,5-13 et plus pour *Tenderette*, et 8-10,5 pour *Corène*). Une telle stabilité masque cependant un appauvrissement relatif en AA de la MS des graines et un enrichissement concomitant de celle des péricarpes.

On peut néanmoins en conclure que l'élévation, en fonction de la date de récolte, des teneurs en AA par unité de poids frais constatée sur la figure 2 est due essentiellement à l'enrichissement des fruits en MS.

b) Il se produit une régression importante des teneurs en AA/g de MS dans les fruits de calibre 8-10,5 de *Tenderette*. L'observation s'applique également, mais toutefois à un degré moindre, aux gousses de calibre 6,5-8 de *Corène*. Cette chute apparaît sur une population en cours de croissance, dont nous avons déjà vu dans l'article précédent que, pour une même classe de calibre, les teneurs en MS ne varient pas au cours du temps.

Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer un pareil état de fait. On peut d'abord l'imputer à des conditions climatiques de plus en plus défavorables au fur et à mesure que la saison avance ; mais on peut également supposer que le développement extrêmement rapide des gousses les plus âgées accapare progressivement toutes les ressources de la plante, laquelle ne se trouve plus en mesure d'alimenter correctement les gousses les plus jeunes issues des dernières floraisons ; celles-ci dégénèrent alors plus ou moins et s'appauvrissent en acide ascorbique. Nous n'avons pas fait une étude précise de cette question, mais un certain nombre d'observations nous conduisent à considérer la deuxième hypothèse comme étant la plus probable.

Les graphiques de la figure 4 expriment, tous calibres confondus, l'évolution des teneurs en AA des graines rapportées à leur poids frais ou à leur poids sec en fonction de leur teneur en MS, celle-ci pouvant être considérée ici comme un moyen de mesure objectif du degré d'évolution physiologique des haricots (Philippon et Rouet-Mayer, 1974).

Pour les calibres supérieurs à 8, lorsque la teneur en AA est rapportée au poids frais (fig. 4 *a* et 4 *a'*) ou à la MS (fig. 4 *b*), les points s'alignent sur une courbe en U.

Dans le cas de la figure 4 *b'*, l'essai n'a pas été poursuivi assez longtemps pour mettre en évidence une éventuelle remontée de la courbe.

Les points représentatifs du plus petit calibre de *Tenderette* ont été affectés d'un chiffre qui indique l'ordre chronologique dans lequel les mesures ont été faites au cours de l'étude. On constate qu'ils se classent verticalement du haut vers le bas du graphique et qu'ils s'insèrent assez mal dans l'alignement des autres points. Il en est de même pour *Corène* avec les points représentatifs du calibre 6,5-8 qui, sur les graphiques 4 *a'* et 4 *b'*, se regroupent indépendamment des autres. Il se confirme donc une nouvelle fois que, dans les graines des fruits de calibre inférieur, la régression en cours du temps des teneurs en AA est indépendante de leur stade d'évolution physiologique.

Remarquons par ailleurs que la comparaison des résultats donnés par les graphiques 4 *a* et 4 *b* montre clairement que la courbe 4 *a* est la résultante de deux phénomènes distincts agissant simultanément et en sens opposés. Le premier corres-

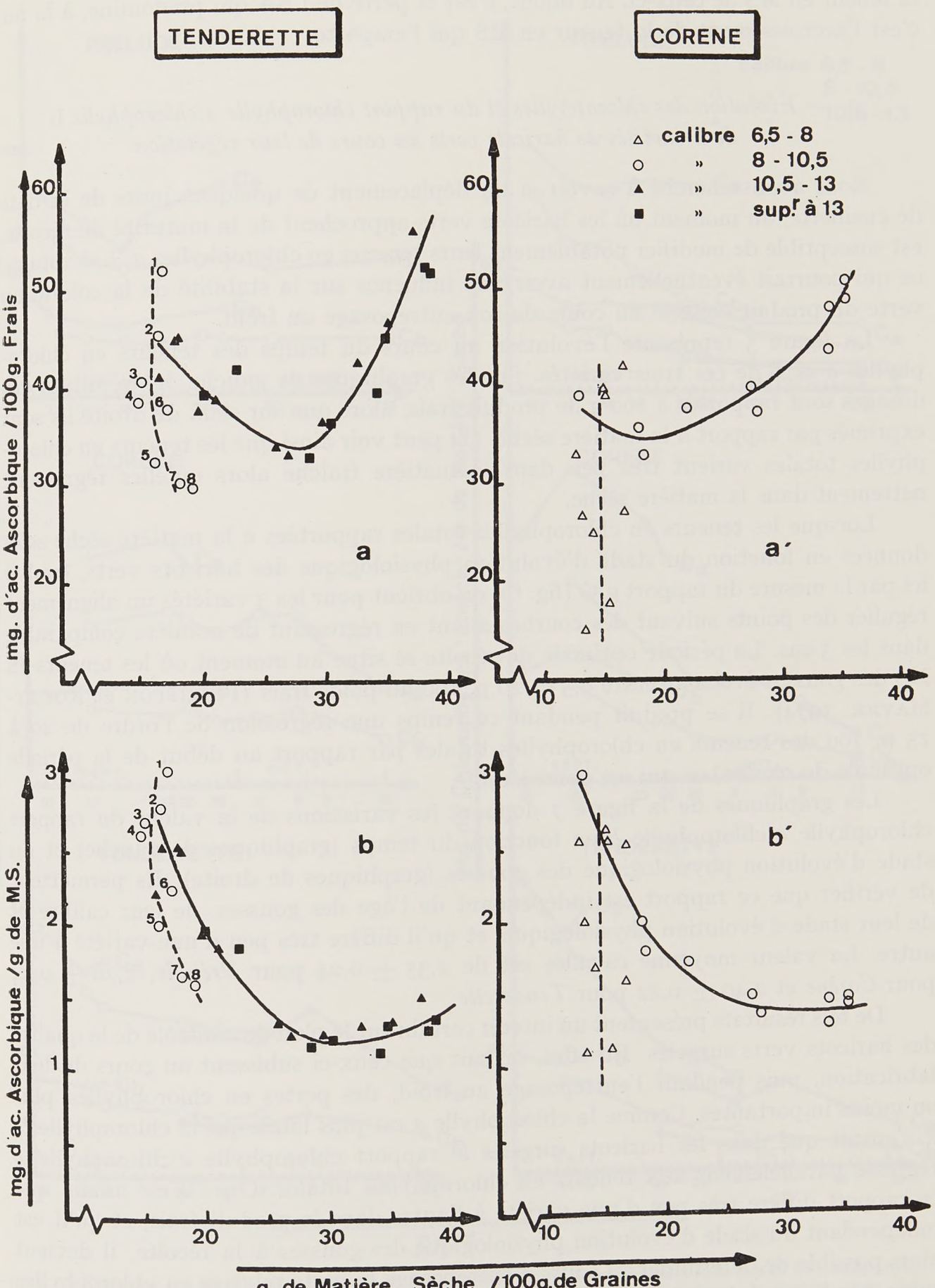


FIG. 4. — *Évolution des teneurs en acide ascorbique* (AA) *des graines rapportées à leur poids frais* (fig. *a* et *a'*) *et à leur poids sec* (fig. *b* et *b'*), *en fonction du stade d'évolution physiologique des haricots, exprimé par la teneur en matière sèche* (MS) *des graines*. Deux variétés étudiées : *Tenderette* et *Corène*.

pond à la régression de l'AA dans la MS des fruits, le second à l'augmentation de la teneur en MS de ceux-ci. Au début, c'est la perte de l'AA qui prédomine, à la fin, c'est l'accroissement de la teneur en MS qui l'emporte.

3. — *Évolution des chlorophylles et du rapport chlorophylle* a/*chlorophylle* b *de 3 variétés de haricots verts au cours de leur végétation*

Nous avons cherché à savoir si un déplacement de quelques jours de la date de cueillette, au moment où les haricots verts approchent de la maturité de récolte, est susceptible de modifier notablement leurs teneurs en chlorophylles *a*, *b* et totales, ce qui pourrait éventuellement avoir une influence sur la stabilité de la coloration verte du produit congelé au cours de son entreposage au froid.

La figure 5 représente l'évolution au cours du temps des teneurs en chlorophylles *a* et *b* de ces trois variétés. Sur les graphiques de gauche, les résultats des dosages sont rapportés à 100 g de produit frais, alors que sur ceux de droite ils sont exprimés par rapport à la matière sèche. On peut voir ainsi que les teneurs en chlorophylles totales varient très peu dans la matière fraîche alors qu'elles régressent nettement dans la matière sèche.

Lorsque les teneurs en chlorophylles totales rapportées à la matière sèche sont données en fonction du stade d'évolution physiologique des haricots verts, évalué ici par la mesure du rapport g/G (fig. 6), on obtient pour les 3 variétés un alignement régulier des points suivant des courbes allant en régressant de manière comparable dans les 3 cas. La période optimale de récolte se situe au moment où les teneurs en MS des gousses évoluent entre 8,5 et 10 p. 100 du poids frais (Philippon et Rouet-Mayer, 1974). Il se produit pendant ce temps une régression de l'ordre de 20 à 25 p. 100 des teneurs en chlorophylles totales par rapport au début de la période optimale de récolte, ce qui est considérable.

Les graphiques de la figure 7 donnent les variations de la valeur du rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* en fonction du temps (graphiques de gauche) et du stade d'évolution physiologique des gousses (graphiques de droite). Ils permettent de vérifier que ce rapport est indépendant de l'âge des gousses, de leur calibre et de leur stade d'évolution physiologique, et qu'il diffère très peu d'une variété à une autre. La valeur moyenne calculée est de 2,35 $\pm$ 0,24 pour *Prélude*, 2,26 $\pm$ 0,24 pour *Corène* et 2,40 $\pm$ 0,22 pour *Tenderette*.

De tels résultats présentent un intérêt certain sur le plan du contrôle de la qualité des haricots verts surgelés. En effet, on sait que ceux-ci subissent au cours de leur fabrication, puis pendant l'entreposage au froid, des pertes en chlorophylles plus ou moins importantes. Comme la chlorophylle *a* est plus labile que la chlorophylle *b*, il s'ensuit que dans les haricots surgelés le rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* régresse parallèlement aux teneurs en chlorophylles totales. Or, s'il est admis que ce rapport diffère très peu d'une variété à l'autre dans le produit frais, et qu'il est indépendant du stade d'évolution physiologique des gousses à la récolte, il devient alors possible de déterminer en cours d'entreposage la perte relative en chlorophylles subie par le produit fini sans qu'il soit nécessaire pour cela de connaître sa teneur initiale.

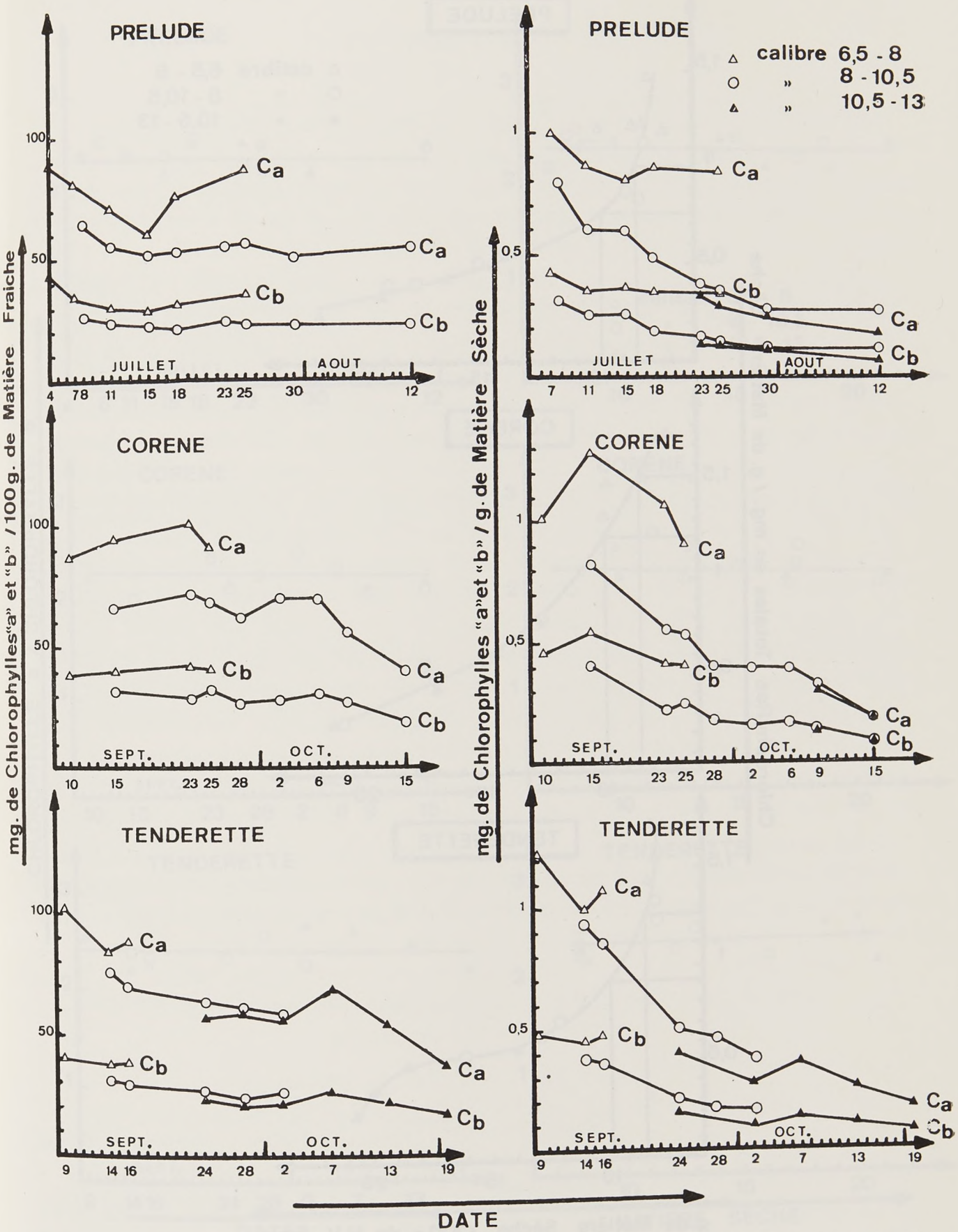


FIG. 5. — *Évolution, en fonction de la date de récolte, des teneurs en chlorophylles* a *et* b, (C*a* et C*b*), *rapportées au poids frais des fruits* (graphiques de gauche) *et à leur poids sec* (graphiques de droite), *pour des gousses de différents calibres de trois variétés de haricots verts.*

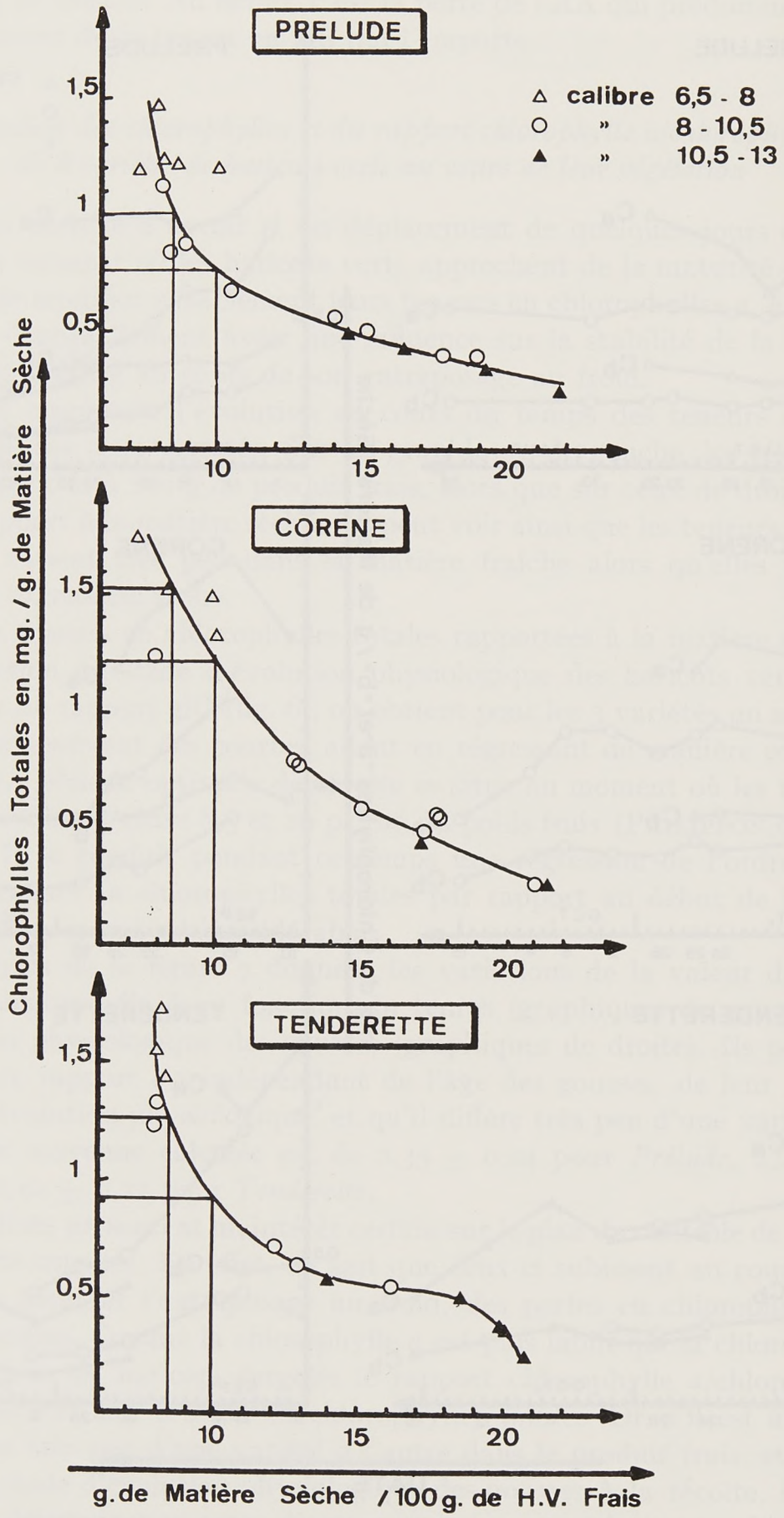


FIG. 6. — *Teneurs en chlorophylles totales de la matière sèche des fruits de trois variétés de haricots en fonction de leur stade d'évolution physiologique à la récolte, exprimé par la teneur en MS de 100 g de haricots verts frais.*

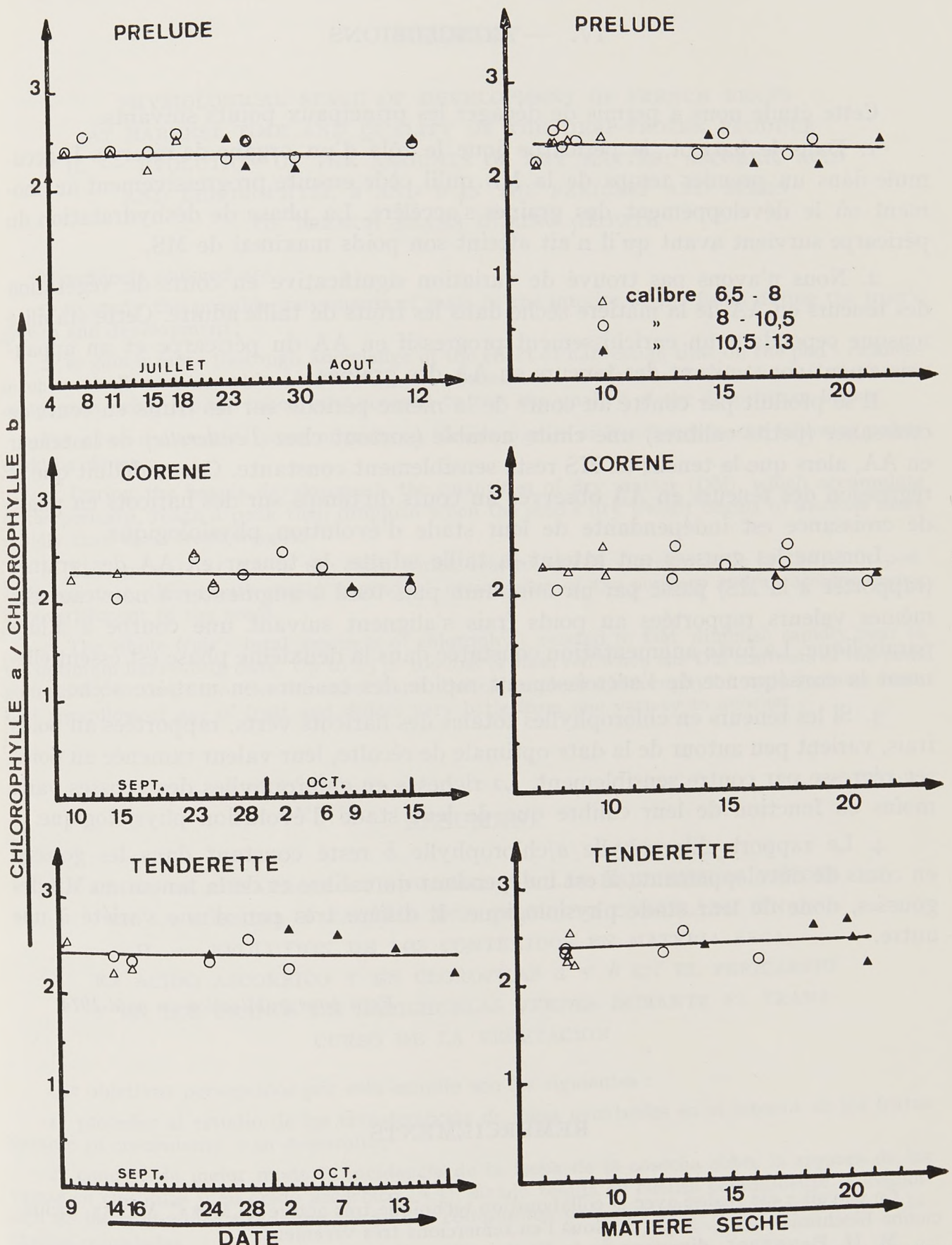


FIG. 7. — *Variations du rapport chlorophylle* a/*chlorophylle* b *de trois variétés de haricots verts en fonction de leur date de récolte* (figures de gauche) *et de leur stade d'évolution physiologique, mesuré par la teneur en matière sèche des fruits* (figures de droite).

IV. — CONCLUSIONS

Cette étude nous a permis de dégager les principaux points suivants.

1. Dans le haricot, le péricarpe joue le rôle d'un organe de réserve. Il accumule dans un premier temps de la MS qu'il cède ensuite progressivement au moment où le développement des graines s'accélère. La phase de déshydratation du péricarpe survient avant qu'il n'ait atteint son poids maximal de MS.

2. Nous n'avons pas trouvé de variation significative en cours de végétation des teneurs en AA de la matière sèche dans les fruits de taille adulte. Cette stabilité masque cependant un enrichissement progressif en AA du péricarpe et un appauvrissement concomitant des teneurs en AA des graines.

Il se produit par contre au cours de la même période sur les fruits en cours de croissance (petits calibres) une chute notable (surtout chez *Tenderette*) de la teneur en AA, alors que la teneur en MS reste sensiblement constante. On en déduit que la régression des teneurs en AA observée au cours du temps sur des haricots en phase de croissance est indépendante de leur stade d'évolution physiologique.

Lorsque les gousses ont atteint la taille adulte, la teneur en AA des graines (rapportée à la MS) passe par un minimum puis tend à augmenter à nouveau. Ces mêmes valeurs rapportées au poids frais s'alignent suivant une courbe à allure parabolique. La forte augmentation constatée dans la deuxième phase est essentiellement la conséquence de l'accroissement rapide des teneurs en matière sèche.

3. Si les teneurs en chlorophylles totales des haricots verts, rapportées au poids frais, varient peu autour de la date optimale de récolte, leur valeur ramenée au poids sec régresse par contre sensiblement. La richesse en chlorophylles des gousses varie moins en fonction de leur calibre que de leur stade d'évolution physiologique.

4. Le rapport chlorophylle *a*/chlorophylle *b* reste constant dans les gousses en cours de développement ; il est indépendant du calibre et de la teneur en MS des gousses, donc de leur stade physiologique. Il diffère très peu d'une variété à une autre.

Reçu pour publication en août 1974.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec la collaboration technique très active de Mlle C. Mayer, technicienne biochimiste au C. N. R. S. Nous l'en remercions très vivement.

M. H. Bannerot, directeur de la Station d'Amélioration des Plantes du C. N. R. A. de Versailles et M. J.-P. Olivier, ingénieur à l'I. N. R. A., ont bien voulu accepter, non seulement de nous fournir la semence, mais encore de faire produire sur leurs terrains d'expérimentation le matériel végétal nécessaire à nos essais. Nous leur adressons nos remerciements les plus vifs et les plus sincères.

SUMMARY

PHYSIOLOGICAL STAGE OF DEVELOPMENT OF FRENCH BEANS AT HARVEST TIME AND QUALITY OF THE DEEP-FROZEN PRODUCE. II. — EVOLUTION OF THE AMOUNTS OF DRY MATTER, ASCORBIC ACID AND CHLOROPHYLL *a* AND *b* IN THE PERICARP AND SEEDS OF FRENCH BEANS DURING GROWTH

The objects pursued are :

1. to study the possible movements of mass to the interior of the fruits during the fruit's growth and development ;

2. to gain a more thorough knowledge of the effect of harvesting time on the pod's richness in chlorophyll and ascorbic acid (AA), the estimate of the residual amounts of these two compounds being jointly taken into account to test the quality of the deep-frozen beans.

From two consecutive years of trials on three varieties of french beans, the following points could be shown :

a) During the bean's development, the quantities of dry matter (DM), which accumulate in the pericarp, reach a peak then diminish when the seed's dry weight begins to increase more rapidly than their fresh weight.

b) The amounts of AA in the bean fruits, related to DM, develop little in the adult pod. In actual fact, this result masks a gradual enrichment of the pericarp and an accompanying impoverishment of the seeds.

c) The whole fruit's total amounts of chlorophyll, related to DM, diminish rapidly near to the optimum harvesting date. Up to 25 p. 100 loss is observed when the DM contents of the pods go from 8.5 to 10 p. 100. On the other hand, the chlorophyll *a*/chlorophyll *b* ratio remains constant regardless of age of fruit and differs very little from one variety to another.

RESUMEN

ETAPA DE DESARROLLO FISIOLOGICO DE LAS HABICHUELAS VERDES EN LA COSECHA Y CALIDAD DEL PRODUCTO CONGELADO FINAL. II. — EVOLUTION DE LOS CONTENIDOS EN MATERIA SECA, EN ACIDO ASCORBICO Y EN CLOROFILAS *a* Y *b* EN EL PERICARPIO Y EN LOS GRANOS DE HABICHUELAS VERDES DURANTE EL TRANSCURSO DE LA VEGETACION

Los objetivos perseguidos por este estudio son los siguientes :

1º proceder al estudio de las transferencias de masa eventuales en el interior de los frutos durante su crecimiento y su desarrollo ;

2º conocer de mejor modo la incidencia de la fecha de la cosecha sobre la riqueza de las vainas en clorofilas y en ácido ascórbico (AA), siendo tenida en cuenta comúnmente la evaluación de los contenidos residuales de ambos compuestos para controlar la calidad de las habichuelas congeladas.

Dos años de experimentaciones consecutivas, efectuadas sobre tres variedades de habichuelas verdes crecidas, han permitido hacer resaltar los siguientes aspectos :

a) durante el transcurso del desarrollo de las habichuelas, las cantidades de materia seca (MS) que se acumulan en el pericarpio pasan por un valor máximo y, acto seguido, acusan cierta regresión una vez que el peso seco de los granos comienza a aumentar von mayor rapidez que su peso fresco ;

b) los contenidos en AA de los frutos de la habichuela, relacionadas a la MS, évolucionan poco cuando se trata de la vaina adulta. Este resultado oculta en realidad un enriquecimiento progresivo del pericarpio y un empobrecimiento concomitente de los granos;

c) los contenidos en cuanto a clorofilas totales de los frutos enteros, relacionados a la MS, acusan rápidamente cierta regresión en las cercanías de la fecha óptima de la cosecha. Se llega a obsrrvar hasta un 25 p. 100 de pérdidas cuando los contenidos en MS de las vainas pasan de un 8,5 a un 10 p. 100. Por el contrario, la relación clorofila *a*/clorofila *b* permanence constante, sea cual fuere la edad de los frutos y difiere muy ligeramente de una variedad a otra.

RIASSUNTO

STADIO DI SVILUPPO FISIOLOGICO DEI FAGIOLINI ALLA RACCOLTA E QUALITA' DEL PRODOTTO SURGELATO FINITO. II. — EVOLUZIONE DEI TENORI DI MATERIA SECCA, DI ACIDO ASCORBICO E DI CLOROFILLE *A* E *B* NEL PERICARPO E NEI SEMI DI FAGIOLINI DURANTE LA VEGETAZIONE

Gli scopi ricercati sono :

1° di studiare i trasferimenti di massa eventuali all' interno dei frutti durante la loro crescita e il loro sviluppo;

2° di conoscere meglio l'incidenza della data della raccolta sulla ricchezza dei baccelli in clorofille e in acido ascorbico (AA) ; la valutazione dei tenori residui di questi due composti è pressa comunemente in considerazione per controllare la qualità dei fagiolini surgelati.

Due anni consecutivi di prove effectuate su tre varietà di fagiolini mangiatutto hanno permesso di raggiungere le conclusioni seguenti :

a) Durante lo sviluppo dei fagiolini, le quantità di meteria secca (MS) si accumulano nel pericarpo, passano per un punto massimo, poi diminuiscono quando il peso secco dei semi si mette ad aumentare più rapidamente rispetto al loro peso fresco.

b) I tenori di AA dei frutti del fagiolo confrontati alle MS hanno un'evoluzione ridotta nel baccello adulto. Questo risultato nasconde in verità un arricchimento progressivo del pericarpo e un impoverimento concomitante dei semi.

c) I tenori di clorofille totali dei frutti interi, confrontati all MS, diminuiscono rapidamente in vicinanza della data ottima della raccolta. Quando i tenori in MS dei baccelli passano da 8,5 a 10 p. 100, si osserva fino a 25 p. 100 di perdite. Il rapporto clorofilla *a*/clorofilla *b* resta invece costante qualunque sia l'età dei frutti e esso differisce pochissimo da una varietà all'altra.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Carr D. J., Skene K. G. M., 1961. Diauxic growth curves of seeds with special reference to french beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Aust. J. Biol. Sci.*, **14** (1), 1-12.

Delaporte N., 1971. Influence de la teneur en oxygène des atmosphères sur le taux d'acide ascorbique des pommes au cours de leur conservation. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **4** (14), 106-112.

Delaporte N., Laval-Martin D., 1971. Analyse spectrophotométrique des chlorophylles et des phéophytines *a* et *b* en milieu hydroacétonique. II. Méthode cinétique de dosage. *Anal. Chim. Acta*, **55**, 425-435.

Delaporte N., Rouet-Mayer M.-A., 1971. Évolution des teneurs en chlorophylles *a* et *b* et en acide ascorbique des gousses de haricots au cours de leur croissance. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, **4** (2), 46-49.

Jones L. H., Corner J. J., 1962. Physiological aspects of dwarf bean maturity. *Proc. First Int. Congr. Food Sci. Technol.*, **2**, 137-147. Gordon and Breach 1965, London.

Philippon J., Rouet-Mayer M.-A., 1974. Stade de développement physiologique des haricots verts à la récolte et qualité du produit surgelé fini. I. Tests objectifs de la qualité des haricot vert frais destinés à la congélation. *Ann. Technol. agric.*, 433-449.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 467-480.

CONDITIONS DE TEMPÉRATURE ET D'HUMIDITÉ RELATIVE A APPLIQUER DANS LES CHAMBRES DE FLORAISON D'ŒILLETS (1)

Barbara NEUMANNOVA et A. PAULIN

Laboratoire de Physiologie des Organes végétaux du C. N. R. S.,
4 ter, route des Gardes,
92190 Meudon

RÉSUMÉ

Les œillets récoltés anticipés se conservent mieux à basse température, ils supportent mieux les transports. Toutefois, leur épanouissement ultérieur est impossible sans l'apport d'une solution nutritive.

La vitesse et la qualité de l'épanouissement d'œillets récoltés en jeunes boutons peuvent être améliorées si, en plus de l'indispensable solution nutritive, on réalise dans les chambres de floraison des conditions physiques favorables.

L'étude a porté sur la température et l'humidité relative. On a pu voir que :

— l'action favorable des solutions nutritives peut être renforcée si on applique, de préférence à une température de 27°C maintenue constante, un double régime thermique (27°C de jour, 18°C de nuit). On augmente alors, particulièrement après des séjours prolongés à basse température, la vitesse d'épanouissement, et, dans tous les cas, la survie ultérieure chez l'utilisateur ;

— à la température de 27°C, des humidités relatives de 35, 55, 75 p. 100 n'exercent pas d'action notable que ce soit sur la vitesse ou la qualité de l'épanouissement ou la durée de survie, que les œillets aient été ou non préalablement conservés au froid. Il n'est donc pas nécessaire de doter les chambres de floraison de dispositifs permettant l'obtention d'humidités élevées.

Mots clés : *œillets, récolte anticipée, chambres de floraison, conditions physiques.*

I. — INTRODUCTION

L'intérêt de pouvoir s'affranchir des servitudes liées au stade de développement à la récolte est considérable. Les fleurs récoltées d'une façon anticipée (jeune bouton) sont beaucoup moins fragiles, elles occupent un moindre volume, elles ont nécessité quelques jours de moins de culture en serre, elles sont moins sensibles aux altérations

(1) Cette recherche a fait l'objet d'un mémoire de fin d'étude de l'E.N.I.T.A. (Dijon) réalisé au laboratoire de Physiologie des Organes végétaux par Mlle B. NEUMANNOVA (1973).

dues aux conditions de conservation frigorifique et de transport. Par contre, leur épanouissement est impossible sans l'appoint d'une solution nutritive appropriée. Ces solutions sont maintenant au point. On dispose ainsi d'une technique qui permet de récolter en période de forte production les œillets en boutons, de les stocker un temps plus ou moins long à basse température, puis de les faire épanouir pour la commercialisation en fonction de la demande. Cet épanouissement est réalisé par le praticien (grossiste ou fleuriste) dans des enceintes chauffées appelées chambres de floraison.

Toutefois, la rapidité et la qualité d'épanouissement sont facilitées si, en plus de l'indispensable solution nutritive, des conditions physiques favorables sont réalisées dans la chambre de floraison. Ces conditions ne sont pas connues avec exactitude et les praticiens utilisent parfois certaines zones de température ou d'humidité relative sans savoir si ce sont réellement les meilleures. C'est ainsi que l'on a pu préconiser l'application d'un double régime thermique (température de jour et de nuit différentes) et des humidités de 80-90 p. 100.

Pour ces raisons, il nous a paru nécessaire d'étudier, en nous limitant à la température et à l'humidité relative, l'influence des conditions physiques des chambres de floraison sur l'épanouissement d'œillets récoltés en boutons et préalablement conservés à basse température. Cette recherche relative à la phase d'épanouissement (nécessairement réalisée par le praticien) a été prolongée par l'étude de l'influence sur la durée de survie ultérieure (qui intéresse le consommateur) des conditions appliquées lors de la floraison.

Nous nous sommes attachés à comparer l'influence d'une température maintenue constante (+ 27°C) à celle d'un double régime thermique (27°C de jour, 18°C de nuit) et, en ce qui concerne l'humidité relative, à comparer l'action exercée par 35, 55 et 75 p. 100 d'humidité relative.

Ces conditions ont été appliquées à des fleurs conservées préalablement 0, 4, 5 ou 6 semaines à 1°C, puis alimentées soit en eau, soit avec une solution nutritive du commerce (Phyllo 2 000), soit avec une solution élaborée au laboratoire (appelée provisoirement et dans un but de simplification S. N. Oe.). Cette étude a compris trois essais désignés respectivement par A (influence de la température), B et C (influence de l'humidité).

2. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

2. 1. — *Le matériel vivant végétal*

Variété. Origine. Date de cueillette.

Les œillets appartenaient à la variété américaine *Scania*. Ils nous ont été fournis par le C. E. T. A. floral du littoral varois, 83 Hyères. Ces œillets provenaient tous de la même serre et avaient été cultivés dans les conditions habituelles de la pratique. Ils ont été cueillis au stade 0 (boutons fermés) à des dates échelonnées, en fonction de leur durée prévue de séjour à basse température, selon le calendrier suivant :

Essai A	*Essai B*	*Essai C*
29 mars	12 avril	10 mai
5 avril	19 avril	24 mai
12 avril	26 avril	
11 mai	24 mai	

Le transport entre Hyères et le laboratoire s'est effectué par voie ferrée, en wagon non réfrigéré ; il a duré 15 heures.

A l'exception des lots mis à fleurir dès la réception, les œillets ont été placés, dès leur arrivée au laboratoire à 1°C dans leur emballage d'expédition, carton doublé intérieurement d'une pellicule de polyéthylène.

Au moment de la mise en floraison, par suite d'une légère évolution inévitable lors de la conservation à 1°C, les fleurs étaient parvenues au stade 1 (boutons fermés). La description des stades d'évolution sera donnée plus loin.

Protocole expérimental. Désignation des lots.

La première expérience (essai A) a servi à comparer deux types possibles de régimes thermiques.

Au cours de la seconde expérience, nous avons comparé les effets de trois humidités relatives échelonnées, 35, 55 et 75 p. 100. Du fait de l'existence de deux chambres de floraison seulement, cette expérience a été réalisée en deux essais, B et C. L'humidité relative de 35 p. 100 a servi de référence commune à ces deux essais.

Chaque lot est caractérisé par quatre paramètres :

— la durée de conservation au froid,
— l'appartenance à un des trois essais,
— la nature du régime thermique ou la valeur de l'humidité relative,
— la nature de l'alimentation.

A chacune de ces données, nous avons associé une lettre ou un chiffre ; un lot est ainsi désigné par la suite ordonnée de ces quatre symboles.

Le premier chiffre : 0, 4, 5, 6 se rapporte à la durée de conservation à 1°C qui a été de 0, 4, 5 ou 6 semaines selon les cas.

Le deuxième symbole : A, B ou C indique l'essai.

Le troisième chiffre : 1 ou 2, a trait à la nature du régime thermique (essai A) ou à la valeur de l'humidité relative (essais B et C) :

essai A { 1 : 27°C continu,
2 : double régime thermique.

essai B { 1 : humidité relative de 55 p. 100,
2 : humidité relative de 35 p. 100.

essai C { 1 : humidité relative de 75 p. 100,
2 : humidité relative de 35 p. 100.

Enfin le dernier chiffre : 1, 2, 3 désigne la nature de l'alimentation :

1 : eau du robinet,
2 : solution nutritive du commerce (Phyllo 2000),
3 : solution nutritive élaborée au C. N. R. S. (S. N. Oe.).

Ainsi, la suite 6 A 12 désigne un lot conservé 6 semaines à 1°C, appartenant à l'essai A, placé à 27°C continu, et alimenté en solution du commerce. Pour alléger l'écriture, nous avons supprimé le 0 initial des lots qui n'ont pas subi de traitement par le froid. C 23 désigne ainsi un lot qui n'a pas séjourné à 1°C, appartenant à l'essai C, placé en humidité relative de 35 p. 100 et alimenté en S. N. Oe.

Préparation et réalisation des lots.

Au moment de la mise en expérience, les fleurs au sortir de la chambre froide ont été triées de manière à éliminer les tiges cassées et les boutons anormaux ou endommagés. On a éliminé également les boutons trop ou pas suffisamment épanouis de façon à obtenir un matériel aussi homogène que possible.

La longueur des tiges a été ensuite ramenée à 60 cm et la section rafraîchie à l'aide d'un rasoir mouillé, pour limiter l'obstruction des vaisseaux par des bulles d'air. Après élimination des feuilles de la base de la tige, des lots de 15 fleurs ont été constitués. Dans tous les essais, on s'est efforcé de « panacher » les lots en répartissant de manière équitable les boutons les plus et les moins évolués. Pour la commodité des observations, chaque lot est réparti dans deux bé-chers contenant chacun 1,5 l de liquide. Chaque fleur reçoit ensuite une étiquette numérotée pour permettre une observation individuelle.

Appréciation de la floraison et de la survie.

Les stades d'évolution.

Les observations journalières portent sur l'état d'évolution de la fleur. Pour pouvoir apprécier la qualité et la vitesse de l'épanouissement, puis de la durée de survie, 7 stades repères ont été retenus. Ces stades sont représentés sur la figure 1.

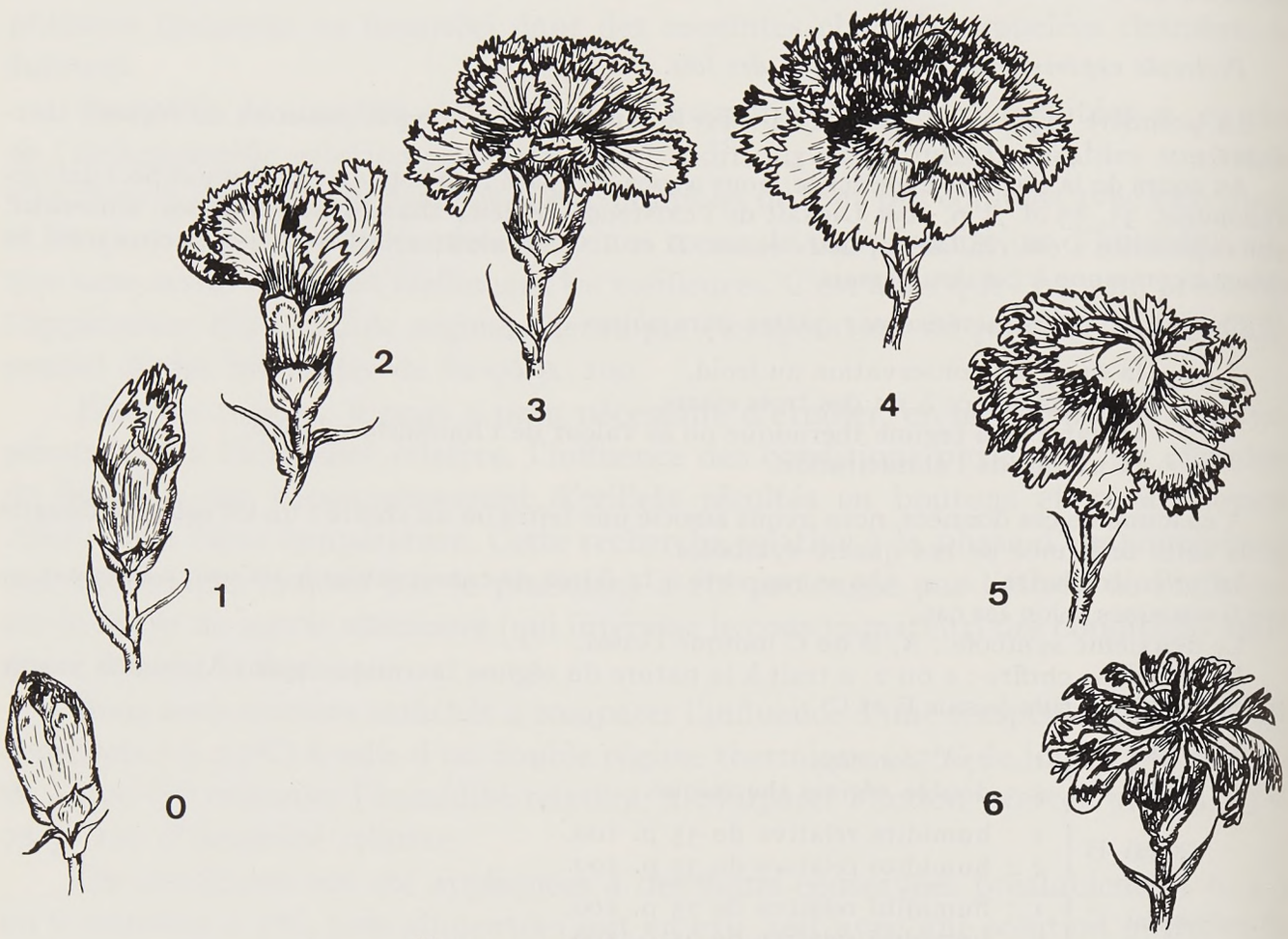


FIG. 1. — *Stades d'évolution utilisés*
Le stade 3 correspond au stade de récolte normal

Stade 0 : bouton très fermé. Le bouton a un aspect pointu et 1 à 1,5 cm de pétales seulement apparaissent au-dehors du calice.

Stade 1 : bouton fermé. Les pétales, qui ont perdu leur aspect pointu, ne sont plus emprisonnés par le calice qu'à mi-hauteur environ (1,5-2 cm).

Stade 2 : bouton ouvert. Le bouton floral prend du volume et les pétales externes commencent à se déployer.

Stade 3 : préépanouissement. Les pétales externes sont tous déployés et horizontaux, les pétales internes restant encore fermés.

Stade 4 : épanouissement. Les pétales internes sont déployés et on aperçoit l'extrémité des pistils au centre de la fleur. Les pétales externes sont recourbés vers le bas et toute la fleur est bien turgescente.

Stade 5 : début de la fanaison. Ce stade est marqué par une perte de turgescence qui se traduit par un affaissement des pétales supérieurs et une diminution du volume total occupé par la fleur. Les bords des pétales externes commencent à se flétrir et on note parfois un début de décoloration.

Stade 6 : fanaison. Les pétales sont nettement fripés et souvent fortement décolorés.

Les critères de floraison et de survie.

Trois critères ont été retenus : la qualité de la floraison, la vitesse d'épanouissement et la durée de survie.

La qualité de la floraison a été appréciée par la mesure au stade 4 du diamètre floral et par des observations portant sur le coloris des pétales.

Pour apprécier la vitesse d'épanouissement des fleurs constituant un lot, on a dénombré chaque jour le nombre de fleurs parvenus au stade 4, on a reporté ces observations sur un graphique et la pente de la courbe rend compte de la vitesse d'épanouissement.

La durée de survie est définie comme le nombre de jours écoulés entre la mise en chambre de floraison et l'apparition de la fanaison débutante. Pour la mesurer, on utilise une méthode chiffrée précédemment décrite (Paulin, 1973).

2. 2. — *Les dispositifs de réalisation de la température, de l'humidité relative, de l'éclairement*

Température.

Les chambres utilisées sont les chambres isothermes habituelles d'étude de la survie. Ces chambres sont équipées d'une puissante installation frigorifique grâce à laquelle le passage de + 27°C (température de jour) à + 18°C peut se faire très rapidement (1 heure environ). L'opération inverse (+ 18 vers + 27°C) a nécessité l'adjonction de résistances électriques commandées par une horloge à programme. L'homogénéité de température a été obtenue par l'action d'un puissant ventilateur. Une courbe de température est donnée figure 2.

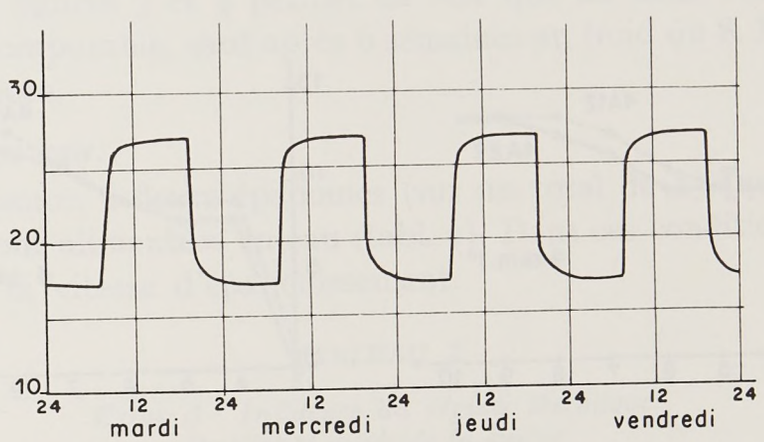


Fig. 2. — *Courbe de température de la chambre fonctionnant en double régime thermique*

La température était contrôlée plusieurs fois par jour au moyen de deux thermomètres à mercure placés aux points extrêmes de la chambre. De plus, nous disposions dans chaque chambre d'un thermomètre enregistreur, préalablement étalonné et réglé à la température de travail, et placé au niveau des fleurs.

Humidité relative.

L'humidité relative est un facteur difficile à régler. Pour l'obtention des humidités de 35 et 55 p. 100, nous avons joué sur la température d'évaporation du fluide frigorigène. Pour la réalisation de l'humidité de 75 p. 100, nous disposions de l'appoint de vapeur d'eau fourni par deux saturateurs d'atmosphère Moulinex, placés en deux points opposés de la chambre. L'humidité relative était mesurée trois fois par jour dans chaque chambre, au moyen d'un psychromètre.

Éclairement.

Un éclairement artificiel de 2 500 lux au niveau des fleurs a été, en outre, appliqué 12 heures sur 24. La lumière fournie est celle dispensée par des tubes fluorescents dits « lumière du jour ».

3. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

Il n'a pas été possible pour des raisons de place de reproduire tous les résultats obtenus ; nous nous sommes limités à la présentation des tableaux et des figures qui nous ont semblé les plus importants.

3. 1. — *Étude de deux régimes thermiques*

L'essai A avait pour but de comparer l'action sur l'épanouissement et sur la durée de survie d'une température de 27°C maintenue constante à deux températures alternées (27°C pendant la phase d'éclairement et 18°C pendant la phase d'obscurité). Dans les conditions de la pratique, ce dernier régime est assez difficile à établir, car il faut pouvoir réaliser rapidement l'élévation et l'abaissement thermique. Cette condition est d'autant plus malaisée à satisfaire que les chambres de floraison sont plus grandes (les installations de chauffage et de refroidissement doivent alors être de forte puissance et il faut également assurer une homogénéité correcte de la température).

Pendant cet essai, l'humidité relative a été maintenue au voisinage de 55 p. 100 dans les deux chambres.

Les résultats des observations sont regroupés dans le tableau 1 (qualité de floraison, durée globale de survie) et figures 3 et 4 (vitesse d'épanouissement).

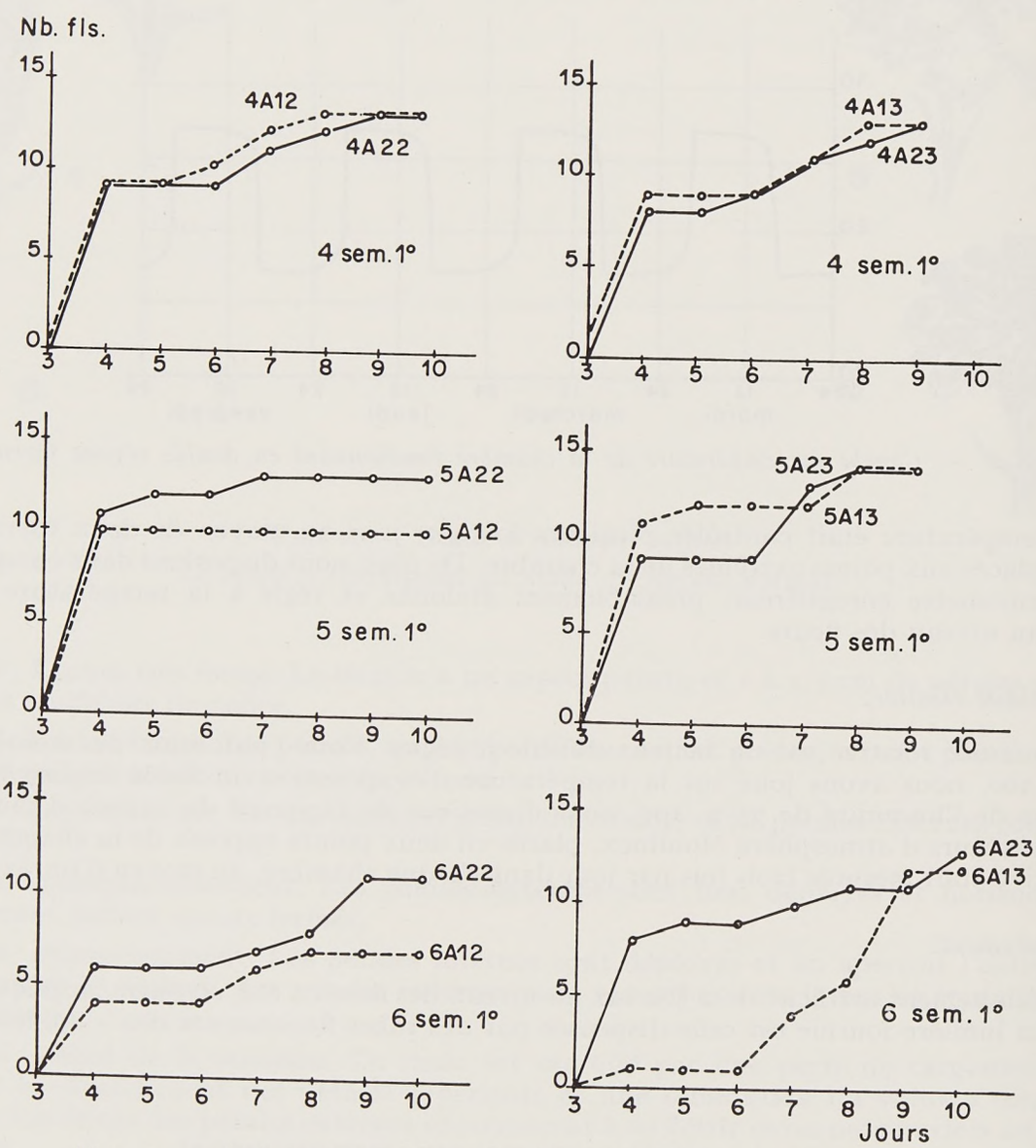


Fig. 3 Fig. 4

FIG. 3. — *Influence du régime thermique sur la vitesse de floraison de fleurs alimentées en Phylo 2000*
(trait pointillé : 27°C continu ; trait plein : double régime thermique)

FIG. 4. — *Influence du régime thermique sur la vitesse de floraison de fleurs alimentées en S. N. Oe.*
(trait pointillé : 27°C continu ; trait plein : double régime thermique)

Vitesses comparées d'épanouissement.

Alimentation en solution du commerce (fig. 3).

Après 4 semaines au froid, l'influence du régime thermique ne se fait pas sentir ; une seule fleur de différence entre les deux lots du cinquième au neuvième jour, même résultat final. Après 5 et 6 semaines au froid, le double régime thermique semble présenter un avantage sur le régime continu : différence de 3 et 4 fleurs épanouies en fin d'essai. D'une manière générale, la vitesse d'épanouissement est ralentie pour les lots qui ont subi la plus longue conservation au froid.

Alimentation en S. N. Oe. (fig. 4).

Après 4 et 5 semaines de séjour à basse température, il n'y a pas d'influence visible du régime thermique. Après 6 semaines au froid, le double régime thermique se révèle nettement supérieur, surtout dans la première semaine de l'essai. Ce point est important, car les fleurs ainsi traitées atteignent plus rapidement le stade commercial de vente.

L'examen des figures 3 et 4 permet de voir que les deux solutions nutritives ont une efficacité comparable, sauf après 6 semaines au froid où S. N. Oe. est significativement supérieure.

Alimentation en eau.

C'est au maximum 6 fleurs épanouies (sur un total de 15) que l'on enregistre lorsque les fleurs sont alimentées en eau (tabl. 1). Dans ces conditions, il n'a pas été possible d'étudier la vitesse d'épanouissement.

TABLEAU I

Essai A : Influence du régime thermique.
Qualité et durée de la survie

+ 27°C jour et nuit				+ 27°C de jour + 18°C de nuit			
Numéro du lot	Nombre de fleurs épanouies (1)	Diamètre moyen de la fleur (en mm)	Durée de survie (2) du lot (en jours)	Numéro du lot	Nombre de fleurs épanouies (1)	Diamètre moyen de la fleur (en mm)	Durée de survie (2) du lot (en jours)
A 11	6	75	0	A 21	4	73	0
A 12	15	83	9	A 22	14	88	11
A 13	15	84	10	A 23	15	88	11
4 A 11	3	69	0	4 A 21	6	80	0
4 A 12	13	89	8	4 A 22	14	89	9,5
4 A 13	15	87	8	4 A 23	14	89	10
5 A 11	4	74	0	5 A 21	5	76	0
5 A 12	15	90	6,5	5 A 22	14	89	10
5 A 13	15	89	8,5	5 A 23	14	87	10,5
6 A 11	0	0	0	6 A 21	0	0	0
6 A 12	14	90	6,5	6 A 22	10	86	10
6 A 13	14	87	8,5	6 A 23	13	86	10,5

(1) sont considérées comme épanouies les fleurs ayant atteint le stade 4.
(2) depuis la mise en chambre de floraison.

Les résultats obtenus avec les lots n'ayant pas subi de conservation au froid n'ont pas été rapportés. Il apparaissait que lorsque les fleurs sont alimentées en S. N. Oe. le double régime thermique présente un léger avantage.

Qualités comparées de l'épanouissement.

La qualité de l'épanouissement a été appréciée par la mesure du diamètre de la fleur au stade 4. Il est à noter que les moyennes du tableau 1 n'ont pas toutes la même signification ; celles des lots alimentés en eau sont faites sur un nombre relativement petit de mesures, de 3 à 6 (dans deux cas, lots 6 A 11 et 6 A 21, on n'a observé aucun épanouissement), alors que celles des lots alimentés en solutions nutritives sont faites sur un nombre de mesures qui varie de 10 à 15. Le nombre de fleurs dont le diamètre a été mesuré est le nombre maximal de fleurs épanouies que l'on trouve dans la colonne « nombre de fleurs épanouies » des tableaux.

Les performances obtenues semblent dès l'abord comparables quelle que soit la solution nutritive apportée. La nature du régime thermique ne semble pas non plus jouer de rôle. L'examen des variances (qui pour ne pas alourdir le texte ne figure pas dans les tableaux) montre que l'alimentation en solution nutritive augmente le diamètre floral, alors que les autres différences observées peuvent être dues aux autres paramètres.

Durées de survie comparées.

Les durées de survie des différents lots figurent dans le tableau 1. On peut en tirer les conclusions suivantes.

Dans nos conditions expérimentales les fleurs alimentées en eau, dont on a vu qu'elles ne s'épanouissaient qu'en très faible nombre, il n'y a pas de survie globale appréciable.

Le double régime thermique présente un certain avantage par rapport à la température de 27°C maintenue constante.

Les deux solutions nutritives exercent, vis-à-vis de la durée de survie, des effets comparables.

L'examen des variances des durées de survie globales confirme l'effet hautement significatif de la nature de l'alimentation et du régime thermique en même temps que l'effet non significatif de la durée de séjour au froid.

3. 2. — *Étude de trois humidités*

L'étude des trois humidités relatives retenues, 35, 55, 75 p. 100, a été réalisée en 2 essais B et C, l'humidité de 35 p. 100 servant de valeur de référence pour les 2 essais.

Essai B.

Cet essai a servi à comparer l'action des humidités relatives de 35 et 55 p. 100 sur la vitesse d'épanouissement, la qualité de la floraison et la durée de survie.

Les résultats des observations ont été regroupés tableau 2 et figures 5 et 6.

Vitesses comparées d'épanouissement.

Comme dans l'essai précédent, les fleurs alimentées en eau ne se sont épanouies qu'en très petit nombre (8 sur 15 dans le meilleur cas) ; l'étude de leur vitesse d'épanouissement ne s'est pas de ce fait révélée possible.

L'étude des figures 5 et 6 permet de voir qu'après 4 semaines de conservation à 1°C les fleurs s'épanouissent sensiblement à la même vitesse à 35 ou 55 p. 100 d'humidité relative.

Après 5 et 6 semaines de conservation, on note que jusqu'au septième jour les fleurs à 55 p. 100 d'humidité sont un peu plus nombreuses à s'épanouir que celles placées à 35 p. 100. Ensuite les différences disparaissent.

Comme dans l'essai A, on constate ici la très grande analogie des performances obtenues avec les deux solutions nutritives et on retrouve l'effet de ralentissement de la vitesse de floraison exercé par un séjour prolongé à basse température.

Lorsque les fleurs n'ont pas subi l'action du froid, elles s'épanouissent à la même vitesse quelle que soit l'humidité relative et la solution nutritive apportée. La courbe se rapportant à ces résultats n'a pas été reproduite.

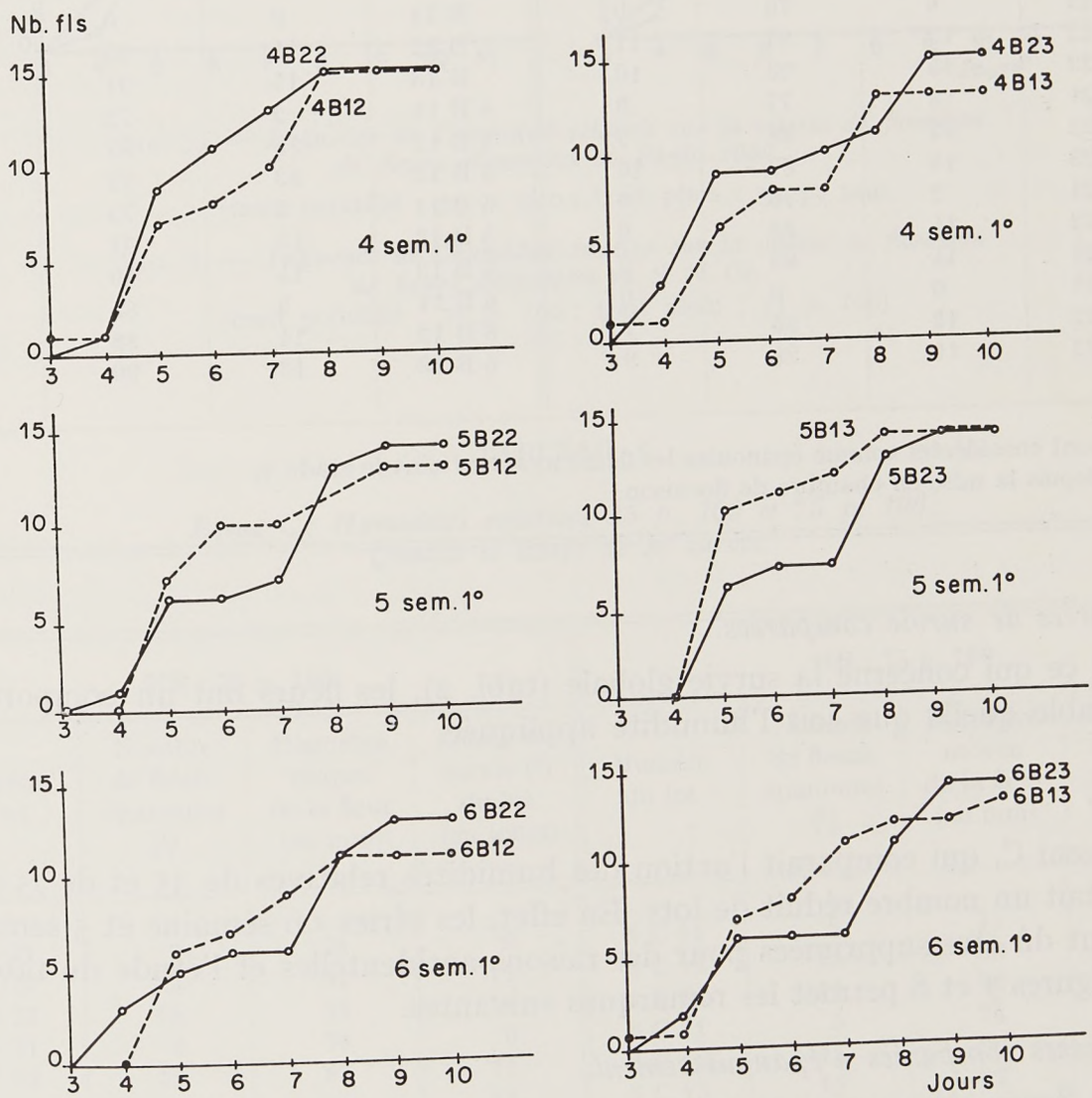


Fig. 5

Fig. 6

FIG. 5. — *Influence de l'humidité relative sur la vitesse de floraison de fleurs alimentées en Phylo 2000*
(trait pointillé : 55 p. 100 ; trait plein : 35 p. 100)

FIG. 6. — *Influence de l'humidité relative sur la vitesse de floraison de fleurs alimentées en S. N. Oe.*
(trait pointillé : 55 p. 100 ; trait plein : 35 p. 100)

Qualités comparées d'épanouissement.

Le diamètre moyen des fleurs ne semble pas influencé par l'humidité relative (tabl. 2). L'examen des variances montre par ailleurs qu'aucune des différences enregistrées n'est significative.

TABLEAU 2

Essai B : Humidités relatives 35 p. 100 et 55 p. 100.
Qualité et durée de la survie

HR : 35 p. 100				HR : 55 p. 100			
Numéro du lot	Nombre de fleurs épanouies (1)	Diamètre moyen de la fleur (en mm)	Durée de survie (2) du lot (en jours)	Numéro du lot	Nombre de fleurs épanouies (1)	Diamètre moyen de la fleur (en mm)	Durée de survie (2) du lot (en jours)
B 21	6	76	0	B 11	0	0	0
B 22	15	94	11	B 12	15	95	10
B 23	15	93	10	B 13	14	91	10
4 B 21	8	77	0	4 B 11	2	72	0
4 B 22	14	88	9	4 B 12	15	87	8,5
4 B 23	15	89	10	4 B 13	13	92	9
5 B 21	2	78	0	5 B 11	5	75	0
5 B 22	14	88	9	5 B 12	13	91	9
5 B 23	14	89	9	5 B 13	14	90	9
6 B 21	0	0	0	6 B 11	3	85	0
6 B 22	13	86	8,5	6 B 12	11	88	7,5
6 B 23	14	88	9	6 B 13	13	90	8

(1) sont considérées comme épanouies les fleurs ayant atteint le stade 4.
(2) depuis la mise en chambre de floraison.

Durées de survie comparées.

En ce qui concerne la survie globale (tabl. 2), les fleurs ont un comportement comparable quelle que soit l'humidité appliquée.

Essai C.

L'essai C, qui comparait l'action des humidités relatives de 35 et de 75 p. 100, comportait un nombre réduit de lots. En effet, les séries « 0 semaine et 5 semaines » à 1°C ont dû être supprimées pour des raisons accidentelles et l'étude du tableau 3 et des figures 7 et 8 permet les remarques suivantes.

Vitesses comparées d'épanouissement.

Les fleurs s'épanouissent à la même vitesse, que l'humidité relative soit de 35 ou de 75 p. 100. Tout au plus pourrait-on voir une légère différence en faveur de 75 p. 100 dans les lots alimentés en solution du commerce et stockés pendant 4 semaines. Cette différence n'apparaît cependant qu'entre les quatrième et septième jours de l'essai.

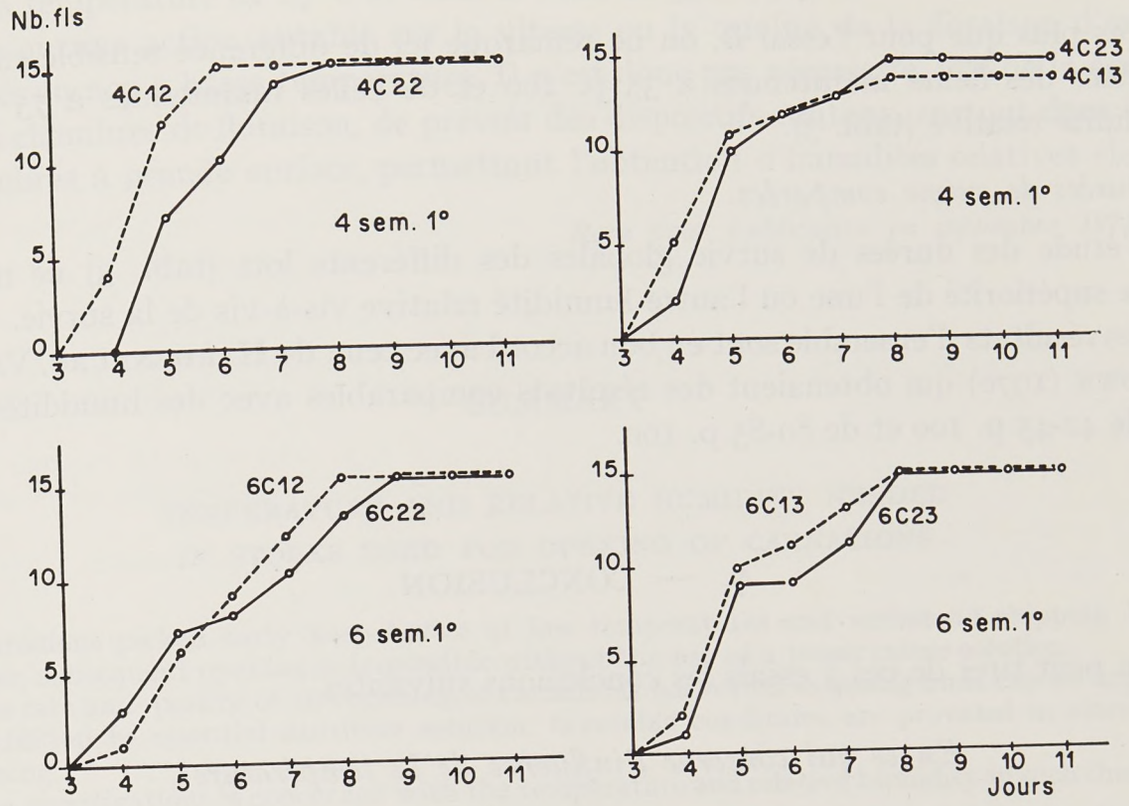


Fig. 7

Fig. 8

FIG. 7. — *Influence de l'humidité relative sur la vitesse de floraison de fleurs alimentées en Phylo 2000*
(trait pointillé : 75 p. 100 ; trait plein : 35 p. 100)

FIG. 8. — *Influence de l'humidité relative sur la vitesse de floraison de fleurs alimentées en S. N. Oe.*
(trait pointillé : 75 p. 100 ; trait plein : 35 p. 100)

TABLEAU 3

Essai C : Humidités relatives 35 p. 100 et 75 p. 100. Qualité et durée de la survie

HR : 35 p. 100				HR : 75 p. 100			
Numéro du lot	Nombre de fleurs épanouies (1)	Diamètre moyen de la fleur (en mm)	Durée de survie (2) du lot (en jours)	Numéro du lot	Nombre de fleurs épanouies (1)	Diamètre moyen de la fleur (en mm)	Durée de survie (2) du lot (en jours)
4 C 21	6	75	0	4 C 11	5	74	0
4 C 22	15	91	11	4 C 12	15	88	11
4 C 23	15	89	11	4 C 13	14	90	11
6 C 21	8	76	0	6 C 11	5	74	0
6 C 22	15	87	11	6 C 12	15	90	9,5
6 C 23	15	88	11	6 C 13	15	87	11

(1) sont considérées comme épanouies les fleurs ayant atteint le stade 4.
(2) depuis la mise en chambre de floraison.

Qualités comparées d'épanouissement.

Pas plus que pour l'essai B, on ne remarque ici de différence sensible entre les diamètres des fleurs maintenues à 35 p. 100 et de celles maintenues à 75 p. 100 d'humidité relative (tabl. 3).

Durées de survie comparées.

L'étude des durées de survie globales des différents lots (tabl. 3) ne montre aucune supériorité de l'une ou l'autre humidité relative vis-à-vis de la survie.

Ces résultats d'ensemble sont en bon accord avec ceux de HARDENBURG, VAUGHT et BROWN (1970) qui obtenaient des résultats comparables avec des humidités relatives de 42-45 p. 100 et de 80-85 p. 100.

4. — CONCLUSION

On peut tirer de ces 3 essais les conclusions suivantes.

En ce qui concerne l'influence de la température

Quel que soit le régime thermique considéré, les fleurs ne s'épanouissent qu'incomplètement lorsqu'elles sont alimentées en eau.

Lorsque les fleurs sont alimentées en solution nutritive, le double régime thermique augmente la vitesse de floraison après une conservation au froid de longue durée et la durée de survie dans tous les cas.

La nature du régime thermique n'exerce pas d'influence sur le diamètre des fleurs épanouies.

En ce qui concerne l'influence de l'humidité relative

Les trois humidités relatives 35, 55 et 75 p. 100 n'exercent pas d'action différente que ce soit sur la vitesse ou la qualité de l'épanouissement ou sur la durée de survie. Cette observation s'applique que les lots aient été ou non préalablement conservés au froid.

Dans tous les cas, seule une alimentation en solution nutritive permet d'obtenir un épanouissement satisfaisant, l'alimentation en eau ne permettant qu'une floraison imparfaite.

Les praticiens intéressés par les résoltes anticipées, dont l'intérêt n'est plus à démontrer, devront tenir compte des points suivants.

Les œillets récoltés dans ces conditions ne s'épanouissent normalement et complètement que si on les alimente avec une solution nutritive appropriée. Leur durée de survie est d'environ 10 jours.

Ces œillets cueillis d'une façon anticipée peuvent être conservés à sec à basse température jusqu'à 6 semaines.

L'action favorable des solutions nutritives peut être renforcée si le régime thermique 27°C de jour, 18°C de nuit est appliqué dans les chambres de floraison. On augmente alors (particulièrement après des séjours de 6 semaines au froid) la vitesse d'épanouissement, et, dans tous les cas, la durée de survie.

A la température de 27°C et dans la zone de 35 à 75 p. 100, l'humidité relative n'exerce aucune action notable sur la vitesse ou la qualité de la floraison d'œillets conservés ou non à basse température. Il n'est donc pas nécessaire, lors de la conception des chambres de floraison, de prévoir des dispositifs coûteux, surtout dans le cas de chambres à grande surface, permettant l'obtention d'humidités relatives élevées.

Reçu pour publication en septembre 1974.

SUMMARY

TEMPERATURE AND RELATIVE HUMIDITY NEEDED IN STORES USED FOR OPENING OF CARNATIONS

Carnations picked early keep better at low temperatures and withstand shipping better. However, subsequent opening is impossible without the use of a preservative solution.

The rate and quality of the opening of carnations harvested as young buds can be improved if, in addition to essential nutritive solution, favorable conditions are provided in stores used for opening.

The investigations is concerned with the temperature and relative humidity in such chambers.

The following conclusions have been drawn.

The favorable effect of nutritive solutions can be improved if, preferably at a constant temperature of + 27°C, a cycle of + 27°C by day and + 18°C by night is used. Especially after long stays at low temperature, this increases the rate of opening and, in all cases, extends flower life when used.

At + 27°C, relative humidities of 35, 55 and 75 p. 100 have no major effect on the rate or quality of opening or on the vase-life whether or not the carnations have been placed in cold storage. Thus, it is not necessary to design stores for opening to obtain high humidity levels.

RESUMEN

CONDICIONES DE TEMPERATURA Y DE HUMEDAD RELATIVA A APLICAR EN LAS CAMARAS DE FLORACION DE CLAVELES

Los claveles cosechados tempranos se conservan mejor a baja temperatura y soportan mejor los transportes. No obstante, su desarrollo completo resulta imposible sin aportación de una solución nutritiva.

La velocidad y la calidad del desarrollo de claveles cosechados en capullos jóvenes puede ser mejorada si, además de la indispensable solución nutritiva, se obtienen condiciones físicas favorables en las cámaras de floración.

El estudio se ha referido al estudio y a la humedad relativa.

Se ha podido apreciar que :

— la acción favorable de las soluciones nutritivas puede ser reforzada si se aplica, de preferencia a una temperatura de 25°C mantenida constante, un doble régimen térmico (25°C de día y 18°C de noche). De este modo se aumenta, en particular después de estancia prolongadas a baja temperatura, la velocidad de desarrollo y, de cualquier modo, la supervivencia ulterior en la case del comprador final ;

— a una temperatura de 27°C, las humedades relativas de 35, 55 y 75 p. 100 no ejercen ninguna acción notable, sea sobre la velocidad o la calidad del desarrollo o la duración de supervivencia, hayan sido o no previamente conservados al frío los claveles. Consecutivamente, no parece necesario dotar a las cámaras de floración de dispositivos que permitan la obtención de porcentajes elevados de humedad.

RIASSUNTO

CONDIZIONI DI TEMPERATURA E D'UMIDITA' RELATIVA DA APPLICARE NELLE CAMERE DI COLTURA DEI GAROFANI

I garofani colti in anticipo si conservano meglio a bassa temperatura e sopportano meglio i trasporti. Per raggiungere tuttavia il momento di migliore fioritura, hanno bisogno dell' apporto di una soluzione nutritiva.

La velocità e la qualità della fioritura di garofani colti allo stato di boccioli possono essere migliorate se, oltre l'indispensabile soluzione nutritiva, si realizzano nelle camere di fioritura le condizioni fisiche favorevoli.

Lo studio riguardava la temperatura e l'umidità relative.

E' stato trovato che :

— l'azione favorevole delle soluzioni nutritive puo' essere rafforzata se si applica, di preferenza a una temperatura di 25°C mantenuta costante, un doppio regime termico (25°C di giorno, 18°C di notte). In queste condizioni, e particolarmente dopo dei soggiorni prolungati a bassa temperatura, si aumenta la velocità di fioritura e, in tutti i casi, la sopravvivenza ulteriore in casa del cliente ;

— alla temperatura di 27°C, delle umidità relative di 35, 55, 75 p. 100 non hanno una grande influenza sulla velocità o sulla qualità della fioritura o sulla durata di sopravvivenza sia che i garofani siano stati o no conservati previamente al freddo. Non è dunque necessario di dotare le camere di fioritura di dispositivit che permettono di ottenere umidità elevate.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

HARDENBURG R. E., VAUGHT H. C., BROWN G. A., 1970. Development and vase life of bud-cut *Colorado* and *California* carnations in preservative solutions following air shipment to Maryland. *J. amer. Soc. Hort. Sci.*, **95** (1), 18-22.

NEUMANNOVA B., 1973. *Influence des conditions physiques des chambres de floraison sur l'épanouissement et la survie d'œillets préalablement conservés à basse température.* Mémoire de fin d'études de l'E. N. I.-T. A. de Dijon.

PAULIN A., 1973. Conditions de réalisation d'essais de survie de fleurs coupées. *Hort. fr.* (35), 3-9.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 481-500.

FERMENTATION INTRACELLULAIRE DES BAIES DE RAISIN AU COURS DE LEUR MÉTABOLISME ANAÉROBIE

C. FLANZY, P. ANDRÉ, P. BENARD*, M. BURET, Y. CHAMBROY* et C. JOURET**

avec la collaboration technique de J. Lardin, Geneviève Migliori, Françoise Pascal, P. Perry, A. Solano et M. Tacchini

Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,
84140 Montfavet

* *Station d'Œnologie et de Technologie végétale, I. N. R. A.,*
11104 Narbonne

** *Station de Technologie des Produits végétaux,*
Centre de Recherches de Toulouse, I. N. R. A.,
31320 Castanet Tolosan

RÉSUMÉ

Le métabolisme anaérobie de baies de raisin placées dans des atmosphères fortement enrichies (95 à 98 p. 100) en CO_2, azote ou argon se manifeste en particulier par la formation d'éthanol. Les résultats présentés portent sur huit années d'expérimentation. Ils correspondent à des bilans des produits principaux et secondaires de la fermentation intracellulaire des raisins.

Les cinétiques d'évolution des produits étudiés (éthanol, CO_2, éthanal, glycérol, composés volatils réducteurs, perte de poids des fruits) sont précisées pour différentes températures. La température influe sur la vitesse initiale de formation d'alcool et sur sa concentration finale dans les baies. La cinétique de production d'éthanol peut être décrite sous une forme mathématique.

Le rendement $\frac{\text{sucres}}{\text{alcool}}$ de la fermentation intracellulaire est du même ordre de grandeur que celui obtenu avec les levures alcooliques habituellement utilisées. Des rapports entre les quantités d'éthanol et celles de divers produits secondaires semblent caractéristiques de la fermentation intracellulaire du raisin.

L'éventualité de l'existence de quelques voies anaboliques de l'éthanol au cours du métabolisme anaérobie fait l'objet d'une discussion.

Mots clés : *métabolisme anaérobie, raisin, fermentation intracellulaire.*

Métabolisme anaérobie du raisin : ensemble des phénomènes qui se déroulent spontanément dans des baies intactes lorsque les fruits sont placés dans une atmosphère dépourvue d'oxygène.

Fermentation intracellulaire : formation d'éthanol dans les raisins au cours de leur métabolisme anaérobie.

In *Vinification par macération carbonique*, S. E. I., I. N. R. A., Paris.

I. — INTRODUCTION

La formation d'éthanol dans les fruits charnus ou « fermentation intracellulaire » (FIC) est l'un des phénomènes caractéristiques de leur métabolisme anaérobie (MA) (Ulrich, 1952). La connaissance des conditions d'apparition de la FIC, des facteurs qui l'influencent, peut permettre une meilleure maîtrise du MA. Cette maîtrise est souhaitable tant dans la conduite de vinifications par macération carbonique (Flanzy, 1935) que pour la mise en œuvre de la technique de conservation en atmosphère contrôlée (Smith, 1963).

C'est pourquoi nous avons cherché à préciser les facteurs induisant la FIC des baies de raisin, les cinétiques de celle-ci en fonction de la température ainsi que les relations pouvant exister entre l'éthanol et les métabolites qui accompagnent sa formation.

Les résultats présentés dans ce mémoire correspondent à la synthèse des données recueillies au cours de huit années d'expérimentation. Certains d'entre eux ont fait l'objet d'une communication aux *Journées Macération carbonique*, 10-11 février 1971, Avignon (Jouret, 1971).

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

Matériel végétal

La majorité des essais a été réalisée avec des baies de *Carignan* noir provenant de la même vigne du domaine expérimental de Pech-Rouge (I. N. R. A., Gruissan). En outre, une quarantaine d'autres cépages ont été utilisés pour l'étude de points particuliers du programme.

Des grappes saines, d'orientation, de volume et de stade de maturité sensiblement identiques sont cueillies après évaporation de la rosée matinale. Les baies d'aspect « homogène » (taille et maturité) sont détachées de la rafle par section du pédicelle au ras du bourrelet. Chaque grappe donne ainsi un ensemble de fruits. Ceux-ci sont distribués un par un en différents lots selon la technique déjà décrite (Flanzy *et al.*, 1967). La dimension finale des lots correspond à un nombre ou, plus rarement, un poids de baies préalablement fixé. Généralement, le lot est constitué de 350 fruits.

Cet échantillon est lavé à l'eau courante ou avec une solution de laurylsulfonate d'ammonium 1/1 000 (*circulaire*, 1970) suivie d'un rinçage à l'eau ; les raisins sont ensuite séchés sur papier filtre.

Conditions expérimentales

L'échantillon est placé dans un bocal Keller de 1,5 ou 4 litres préalablement lavé avec une solution de laurylsulfonate d'ammonium 1/1 000, rincé puis séché à l'étuve.

Le fond du ballon reçoit parfois quelques grammes d'acide salicylique destiné à éviter le développement éventuel de micro-organismes dans le moût qui peut exsuder des baies après un temps assez long de conservation. Le bocal fermé est balayé par un courant du gaz choisi, azote, argon ou dioxide de carbone, égal à cinq fois son volume. Dans ces conditions, sa teneur en oxygène résiduel est au plus égale à 1 p. 100.

Après équilibre des pressions avec l'atmosphère, le bocal est relié à un dispositif de piégeage permettant le dégagement de gaz mais non la rentrée d'air dans l'enceinte expérimentale. L'ensemble du dispositif est alors transféré dans une chambre obscure thermostatée.

Après des temps variables de stockage à la température de l'expérience, les bocaux sont ouverts. Le moût de chaque échantillon est alors extrait, sous gaz inerte (N_2 ou A), par un appareil pneumatique exerçant une pression de 3 kg par cm^2 de surface utile.

Techniques analytiques

Les analyses des composés en solution dans le protoplasme ou les vacuoles se réalisent à partir du moût obtenu au pressurage. La mesure des quantités de substances volatiles réductrices dégagées au cours du MA s'effectue au moyen des systèmes de piégeage (solution sulfurique de $K_2Cr_2O_7$) reliés à l'enceinte expérimentale. Les volumes de gaz carbonique échangés sont enregistrés au moyen d'un appareillage original à pression constante précédemment décrit (Chambroy, Ferry, Flanzy, 1970).

Des techniques classiques sont utilisées pour doser les métabolites suivants : éthanol et produits réducteurs volatils (Flanzy *et al.*, 1969), glycérol (Bouzigues, 1953), éthanal (Jaulmes, Espezel, 1951), acidité volatile (Jaulmes, 1951), sucres réducteurs (G. Bertrand) après défécation mercurique (Semichon, Flanzy, 1926).

Expression des résultats

Les résultats sont généralement ramenés à 1 000 g de baies au départ de l'expérimentation. Le rapport $\frac{\text{poids de baies}}{\text{volume théorique de moût correspondant}}$ a été fixé à 1,2. En effet, les mesures réalisées sur *Carignan* noir montrent que, dans les conditions de la pratique, 1 000 ml de moût sont obtenus, en moyenne, à partir de 1 200 g de raisins.

III. — RÉSULTATS — DISCUSSION

1. — *Caractéristiques générales d'apparition de la fermentation intracellulaire dans des baies de raisin mûres et saines*

Milieu ambiant.

La FIC est étroitement liée à la composition de l'atmosphère dans laquelle se trouve plongé le fruit.

Dans tous nos essais, où l'atmosphère est formée en majeure partie (95 à 98 p. 100) d'argon, de dioxyde de carbone ou d'azote, nous notons une production d'éthanol.

La FIC se manifeste dans certaines limites de température. Une faible quantité d'éthanol (0°30 en 35 jours) apparaît dans des raisins placés à 3°C sous CO_2. La limite supérieure de température au-dessus de laquelle ce métabolisme ne se manifeste plus n'est pas établie avec précision. En effet, durant le réchauffement des raisins jusqu'à la température testée, les systèmes enzymatiques impliqués dans la formation d'alcool sont activés avant d'être plus ou moins inhibés. Aussi est-il difficile, avec notre technique, de discriminer l'éthanol formé à la température étudiée de celui élaboré durant la montée à cette température. Nous constatons seulement qu'à 85°C la production d'éthanol est fortement ralentie par rapport à celle obtenue à 35°C.

Il ressort de ces résultats que la formation d'éthanol par MA a lieu dans une gamme assez étendue de températures.

Agent de la formation d'éthanol.

Dans le passé, des essais réalisés dans des conditions rigoureuses d'asepsie et d'anaérobiose ont souligné que la formation d'éthanol est strictement liée à certains

systèmes enzymatiques des fruits et qu'elle s'effectue sans intervention extérieure de micro-organismes (PASTEUR, 1879 ; MATRUCHOT, MOLLIARD, 1903).

En 1970, nous avons comparé des lots de raisins, placés dans nos conditions habituelles d'expérimentation, à des lots de raisins soigneusement lavés puis enrobés d'une micropellicule d'Hydrasil. Cette substance antifanante doit rendre la baie imperméable aux micro-organismes. La production d'éthanol est la même dans les lots traités et les lots témoins correspondants. Ce résultat confirme les conclusions précédentes.

2. — *Étude de la production d'éthanol*

Cinétique.

L'allure générale de la production d'éthanol avec les trois gaz utilisés est représentée dans la figure 1. La quantité d'éthanol croît jusqu'à un palier ; parallèlement, la vitesse quotidienne du phénomène, sensiblement constante dans un premier temps, décroît puis tend à devenir nulle.

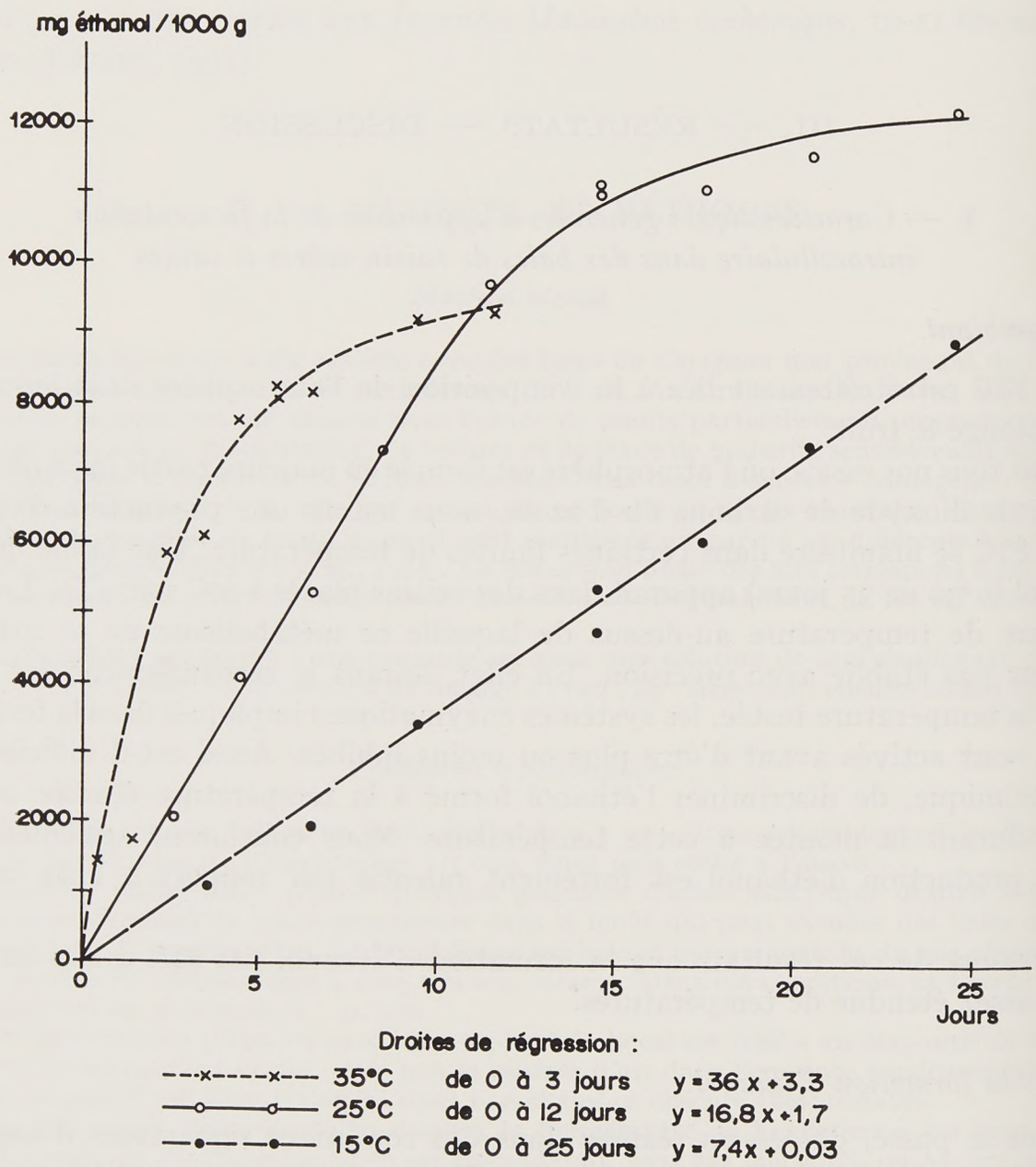


FIG. 1. — *Cinétiques de formation d'éthanol en fonction de la température*

Facteurs influençant la production d'éthanol.

Température.

La température agit à la fois sur la vitesse initiale de la FIC et sur la valeur du palier correspondant à la quantité maximale d'éthanol élaboré.

En effet, d'une part la vitesse initiale croît avec la température et, d'autre part, le palier semble s'élever lorsque la température s'abaisse (fig. 1). Les valeurs des $Q_{10}\,{}^{35}_{25}$ et $Q_{10}\,{}^{25}_{15}$ sont du même ordre de grandeur (tabl. 1). Sensiblement constants dans une première phase, les Q_{10} diminuent par la suite. L'abaissement du $Q_{10}\,{}^{25}_{15}$ est retardé par rapport à celui du $Q_{10}\,{}^{35}_{25}$: la diminution enregistrée pour ce dernier après le troisième jour n'intervient qu'entre le dixième et le quinzième jour pour $Q_{10}\,{}^{25}_{15}$.

TABLEAU I

Formation d'éthanol. Évolution des Q_{10} entre 15 et 35°C

Intervalle de temps (jours)		0 à 1	1 à 2	2 à 3	3 à 5	5 à 10	10 à 15	15 à 20	20 à 25
Q_{10}	25°C / 15°C	2,50	2,22	2,26	2,27	2,27	1,36	0,40	0,19
Q_{10}	35°C / 25°C	2,12	2,18	2,16	1,36	0,32			

Cépage : *Carignan*. Agent d'anaérobiose : CO_2

Une interprétation de ces phénomènes peut être proposée.

La température d'expérience provoquerait au niveau des baies placées en anaérobiose un « choc thermique » (BURET, travail en cours). Le choc thermique conduirait, après un temps plus ou moins long, à une désorganisation cellulaire irréversible (dénaturation de protéines ou libération d'enzymes lysosomales par exemple) qui aurait pour effet d'arrêter la formation d'éthanol ; elle serait d'autant plus précoce et (ou) rapide que la température s'élèverait.

Ces hypothèses sont en accord avec la chute des Q_{10} après un certain temps d'anaérobiose et la chute échelonnée des Q_{10}, le $Q_{10}\,{}^{35}_{25}$ précédant de quelques jours le $Q_{10}\,{}^{25}_{15}$.

Deux phénomènes particuliers, tous deux sous la dépendance de la température, coexisteraient donc en anaérobiose, la production d'éthanol et la désorganisation cellulaire tendant à arrêter cette production. La désorganisation cellulaire pourrait s'accélérer davantage que la formation d'éthanol lorsque la température croît (fig. 2). Par exemple, le $Q_{10}\,{}^{35}_{25}$ de la désorganisation cellulaire aurait une valeur supérieure à celle du $Q_{10}\,{}^{35}_{25}$ de production d'éthanol. Ceci expliquerait que le palier obtenu à 25°C soit plus élevé que celui atteint à 35°C (fig. 1). Si une telle hypothèse se vérifie, pour un certain couple de températures (20 et 30°C par exemple)

le niveau du palier doit être identique, l'atteinte de ce palier étant décalée dans le temps entre ces deux températures.

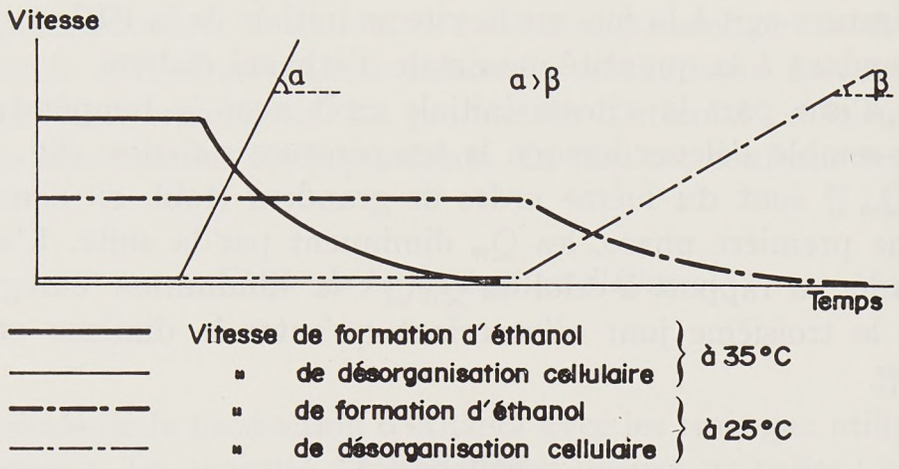


FIG. 2. — *Température et vitesses comparées des deux phénomènes*

Nous sommes conduits à rechercher la température optimale de formation d'éthanol pour un laps de temps donné de MA. Nous choisissons un intervalle de temps relativement court de façon à ce qu'il reste compatible avec une durée raisonnable d'expérimentation. Ainsi, à 5 et 8 jours d'anaérobiose, la température optimale se situe entre 30 et 35°C (fig. 3). D'une manière plus générale, l'optimum de tempé-

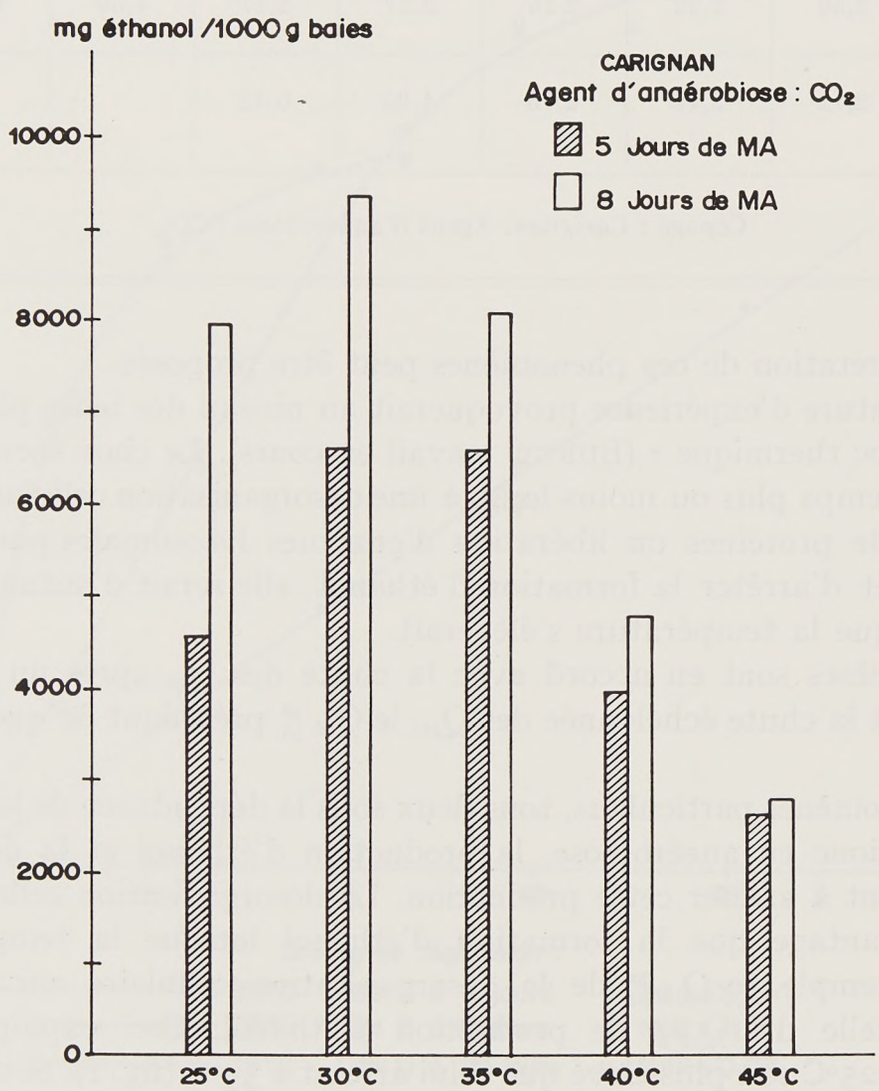


FIG. 3. — *Influence de la température sur la formation d'éthanol*

rature est atteint entre 25 et 35°C du premier au quinzième jour de FIC.

Il faut noter que la température optimale ainsi définie ne correspond pas nécessairement à la température optimale d'autres métabolismes durant cette fermentation.

Nature du gaz ambiant.

L'étude statistique d'une centaine de résultats obtenus au cours d'essais réalisés de 1965 à 1967 ne fait pas apparaître de différences significatives entre les quantités d'alcool formé dans des baies placées sous CO_2 et celles des baies plongées dans l'azote. Il en est de même lorsque la comparaison porte sur le dioxyde de carbone et l'argon (tabl. 2). Toutefois, dans un essai mené en 1969, ces deux derniers gaz conduisent à des résultats moyens différents avec une probabilité de 89 p. 100 ($P = 0{,}11$). D'autre part, il a été montré qu'une fraction du CO_2 des enceintes expérimentales est métabolisé par les raisins sous forme, principalement, d'acide malique (Flanzy *et al.*, 1969 *b*). Cet acide malique est, à son tour, partiellement transformé en éthanol (Flanzy, Buret, Chambroy, 1971). Cependant, les quantités d'éthanol élaborées par cette voie sont vraisemblablement trop faibles pour introduire des différences nettes dans nos essais comparatifs.

TABLEAU 2

Formation d'éthanol sous différentes atmosphères

Durée du MA (jours)	3	6	8	10
CO_2	0°58	1°32	1°40	1°42
A	0°59	1°23	1°42	1°62

Cépage : *Carignan*. Température : 35°C

Cépage. Facteurs annuels. Stade physiologique. Richesse en sucres.

La quantité d'éthanol formé semble être fonction du cépage (tabl. 3), de l'origine des échantillons (tabl. 3), de l'année d'expérimentation (tabl. 4), du stade physiologique (tabl. 5). L'influence sur la production d'alcool de la richesse des baies en sucres réducteurs, avant tout départ en fermentation, n'a pas été mise nettement en évidence (tabl. 4).

Les résultats présentés dans ce chapitre correspondent à des échantillons individuels n'ayant pas fait l'objet de répétitions. Dans ces conditions, leur précision est de $\pm$ 20 à 30 p. 100 pour une probabilité (P) de 0,05. Une telle précision conduit assez souvent à des variations du même ordre de grandeur que les écarts observés entre résultats.

TABLEAU 3

Éthanol formé dans les baies de divers cépages

Cépage	Sucres témoin (g/l)	Éthanol (°GL)	Cépage	Sucres témoin (g/l)	Éthanol (°GL)	Cépage	Sucres témoin (g/l)	Éthanol (°GL)
Alicante B.	177	1°52	*Vaccarèse*	202	1°43	*Muscat* blanc	227	0°44
Alph. Laval.	187	2°16	*Counoise*	166	1°42	*Piquepoul*	256	1°02
Aramon	176	0°91	*Grenache* noir	204	1°07	*Rolle*	212	1°46
Aubun	190	2°23	*Grenache* gris	240	0°75	*Servant*	181	1°11
Bourboulenc	188	1°63	*Grenache* blanc	229	1°18	*Clairette* rose	187	0°76
Cabernet Sauvignon	232	0°93	*Maccabeu*	202	0°74	*Clairette* bl. Pech rouge	199	1°34
Carignan noir	199	1°40	*Madeleine angevine*	157	1°13	*Clairette* bl. Sablet	176	0°33
Chasselas	170	1°49	*Mondeuse*	176	1°20	*Terret* gris	182	1°13
Cinsaut	200	1°57	*Mourvèdre*	204	1°08	*Terret* blanc	186	0°91
Muscat noir	169	1°74	*Muscardin*	185	1°29	*Tibouren*	177	0°80

Provenance	Sucres témoin (g/l)	Éthanol (°GL)	Provenance	Sucres témoin (g/l)	Éthanol (°GL)
Syrah 1970 Pech Rouge	188	0°98	*Syrah* 1972 Pech Rouge	204	0°54
Syrah 1970 Châteauneuf-du-Pape	189	0°70	*Syrah* 1972 Châteauneuf-du-Pape	202	0°83
Syrah 1970 Rians	226	0°96			

MA de 10 jours à 35°C. Agent d'anaérobiose : CO_2

TABLEAU 4

Éthanol formé dans les baies en fonction de l'année

Année	1965	1966	1967	1968	1969	1970	1971	1972	1973
Sucres départ (g/l)	205	206	197	209	185	199	190	196	230
Éthanol (°GL)	1°22	1°43	1°50	1°41	1°21	1°40	1°53	1°03	1°54

Cépage : *Carignan* de même origine. MA de 10 jours à 35°C.
Agent d'anaérobiose : CO_2

TABLEAU 5

Éthanol formé dans les baies à divers stades physiologiques

	Durée du MA (jours)	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12
Date de départ	10-VIII-70	0°22	0°47	0°54	0°58	/	/	0°44	0°58	/	/
	14-IX-70	0°21	0°26	0°86	0°92	1°18	1°23	1°23	1°32	1°38	1°40

Atteint plus rapidement, le palier est d'un niveau plus bas avec les baies en cours de véraison que celui obtenu avec les baies mûres.

	Durée du MA (jours)	1	2	3	4	5	6	8	9	11
Date de départ	7-IX-72 { S = 167 AT = 8,3	/	/	/	1°44	/	1°32	1°68	1°70	1°57
	19-IX-72 { S = 190 AT = 7	/	0°69	0°88	1°03	/	1°08	/	/	/
	28-IX-72 { S = 196 AT = 6,4	0°25	0°57	0°95	1°16	1°30	1°40			

S : sucres réducteurs (g/l) ; AT : acidité totale en H_2SO_4 (g/l).

A des stades proches de la maturité, des baies de teneurs différentes en sucres et acides présentent des cinétiques de production d'éthanol très proches.

Carignan de même origine. MA à 35°C.
Agent d'anaérobiose : CO_2

3. — *Relations entre l'éthanol formé et d'autres métabolites*

Comme pour d'autres fruits charnus, la formation d'éthanol dans des raisins subissant le MA s'accompagne d'une diminution de la teneur des baies en sucres réducteurs et d'un dégagement de gaz carbonique.

Sucres réducteurs.

La mesure de la consommation des sucres réducteurs est sujette à un certain nombre d'erreurs, comme l'a souligné FIDLER dans ses essais sur les pommes (FIDLER, 1951). Elle est obtenue par différence entre la concentration en sucres du lot témoin initial et la concentration de l'échantillon à la fin de l'expérience. Or, la diminution de la teneur en sucres est relativement faible au cours de nos essais. Dans ces conditions, les erreurs dues à la méthode de dosage et à l'échantillonnage prennent une grande importance.

Ainsi, le rendement de transformation des sucres en éthanol, calculé à partir d'un essai réalisé en 1965, est de 22 g/l pour 1°GL. En tenant uniquement compte de la précision admise pour les dosages de sucres réducteurs (G. BERTRAND, 2 p. 100), le rendement peut être estimé à 17,5 g de sucres pour 1°GL. En 1966, le traitement des résultats obtenus sur douze échantillons donne une valeur de 14, 19 g/l de sucres. La précision de cette moyenne est de $\pm$ 22 p. 100 pour P = 0,05.

Dans ces conditions, nous pouvons dire seulement que le rendement paraît être du même ordre de grandeur que celui obtenu avec des levures alcooliques habituellement rencontrées en œnologie. Un tel résultat est en accord avec les données de la littérature (PEYNAUD, GUIMBERTEAU, 1962).

Dioxyde de carbone.

Le MA de baies de raisin placées dans une atmosphère de CO_2, d'azote ou d'argon se traduit, après un certain temps de stockage, par un dégagement de gaz carbonique (CHAMBROY, 1971).

La cinétique d'échange de CO_2 entre les baies et l'atmosphère de l'enceinte présente une phase d'absorption suivie d'une phase de dégagement du gaz (fig. 4).

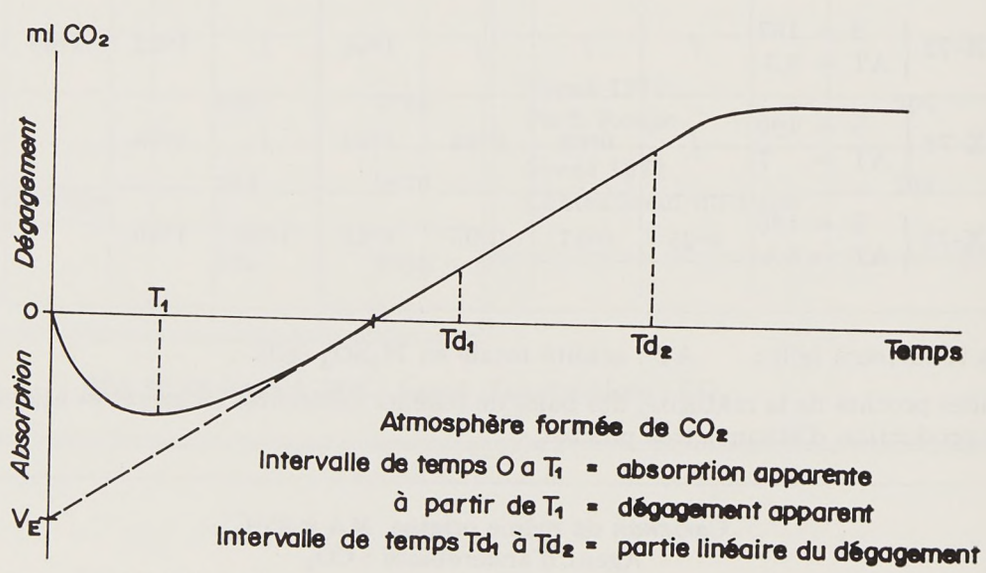


FIG. 4. — *Cinétique d'échange de CO_2 entre les baies et l'atmosphère de l'enceinte*

TABLEAU 6

Vitesse de dégagement du CO_2 au cours du MA

	1971 *Servant*		1973 *Carignan*	
θ°C	Intervalle Td_1-Td_2	v	Intervalle Td_1-Td_2	v
40	3-10	72,0	4-13	96,7
35	16-28	60,6	/	/
30	27-42	41,2	8-21	31,4
25	53-75	26,4	7-22	22,0
20	80-136	17,4	13-25	19,8
15	/	/	90-210	9,5

v = ml CO_2/h/kg baies ; calculé pour l'intervalle de temps correspondant à une fraction de la partie linéaire de la phase de dégagement.

TABLEAU 7

Éthanol formé (mM) *pour 100 mM de CO_2 dégagé*

Année	Cépage	Durée du MA	X
1970	*Chasselas*	6,5 j	79
	Chasselas	6,5 j	89
	Madeleine a.	9 j	76
	Servant	4 j	83
1971	*Carignan*	62 h	76
		69 h	81
		169 h	81
1972	*Carignan*	23 h	73
		23 h	70
		23 h	65
	Carignan	19 h	79
		22 h	69
		22 h	72

X : millimoles (mM) d'éthanol formé à 35°C.

Dans cette deuxième phase, nous distinguons une partie à vitesse croissante et une partie linéaire. La vitesse de dégagement est calculée sur cette partie linéaire. Le dégagement de CO_2 diminue ensuite ; il devient nul après une durée du MA sensiblement identique à celles observées pour l'atteinte des paliers dans la production d'éthanol ou le catabolisme de l'acide malique (FLANZY *et al.*, 1967).

Les résultats actuellement acquis montrent que la vitesse de dégagement de CO_2 pendant la phase linéaire croît dans les limites de températures testées de 15 à 40°C (tabl. 6). Ceci rejoint les observations réalisées sur l'évolution de la vitesse initiale de la FIC en fonction de la température.

Au cours du MA des fruits charnus, le rapport $\frac{\text{gaz carbonique dégagé}}{\text{éthanol formé}}$ est supérieur à 1 (ULRICH, 1952). Pour le raisin placé en atmosphère de CO_2, ce rapport oscille entre $\frac{100}{70}$ et $\frac{100}{90}$ (tabl. 7).

Perte de poids.

Nous avons cherché à mettre en parallèle la production d'éthanol et la diminution de poids des échantillons. Ce dernier phénomène est facilement suivi par pesées ; en outre, la perte de poids d'un échantillon donné est obtenue sans avoir besoin de se rapporter au poids initial d'un témoin (comme pour les sucres).

La représentation des pertes de poids en fonction du temps, mesurées sur 6 années à partir de raisins de même origine, présente certaines analogies de forme avec celle correspondant aux quantités d'éthanol élaboré. Le rapport $\frac{\text{perte de poids en mg}}{\text{7943 mg d'éthanol (1°GL)}}$ semble croître dans les premiers jours d'anaérobiose puis, dès le quatrième jour, atteindre un palier où la perte de poids est d'environ 9 500 mg.

L'étude statistique d'un ensemble de 102 mesures, réalisées sur des raisins placés à 35°C, permet de donner les équations de régression liant la durée X du MA à la perte de poids Y_1 ou à la quantité d'éthanol Y_2 :

$$Y_1 = -1\,060{,}10 + 2\,652{,}15\,X - 180{,}28\,X^2 + 4{,}10\,X^3$$
$$Y_2 = 293{,}60 + 1\,882{,}97\,X - 126{,}48\,X^2 + 2{,}99\,X^3$$

Les coefficients de ces deux équations sont hautement significatifs. En revanche l'équation donnant Y_2 en fonction de Y_1 n'est pas significative :

$$Y_2 = 1\,412{,}38 + 0{,}70\,Y_1$$

Cette dernière observation peut signifier qu'au cours du MA plusieurs phénomènes cataboliques, dont ceux générateurs d'éthanol, évoluent selon des lois différentes. L'importance respective de chacun d'eux varie durant l'anaérobiose ; les phénomènes liés à la synthèse de l'éthanol ne sont pas prédominants.

4. — *Produits secondaires de la fermentation*

Des produits secondaires apparaissent dans la FIC des raisins : glycérol, éthanal, acides organiques volatils, composés réducteurs, acide succinique.

Glycérol.

Dans nos essais, la production de glycérol, à 35°C, est très rapide au début, passe par un maximum entre le deuxième et le septième jour, puis s'abaisse jusqu'à un palier (fig. 5). Le niveau de ce palier est situé entre 1,5 et 3 g/l, selon l'année ; en revanche, le niveau semble le même, pour une année donnée, et pour les températures considérées (15 à 35°C).

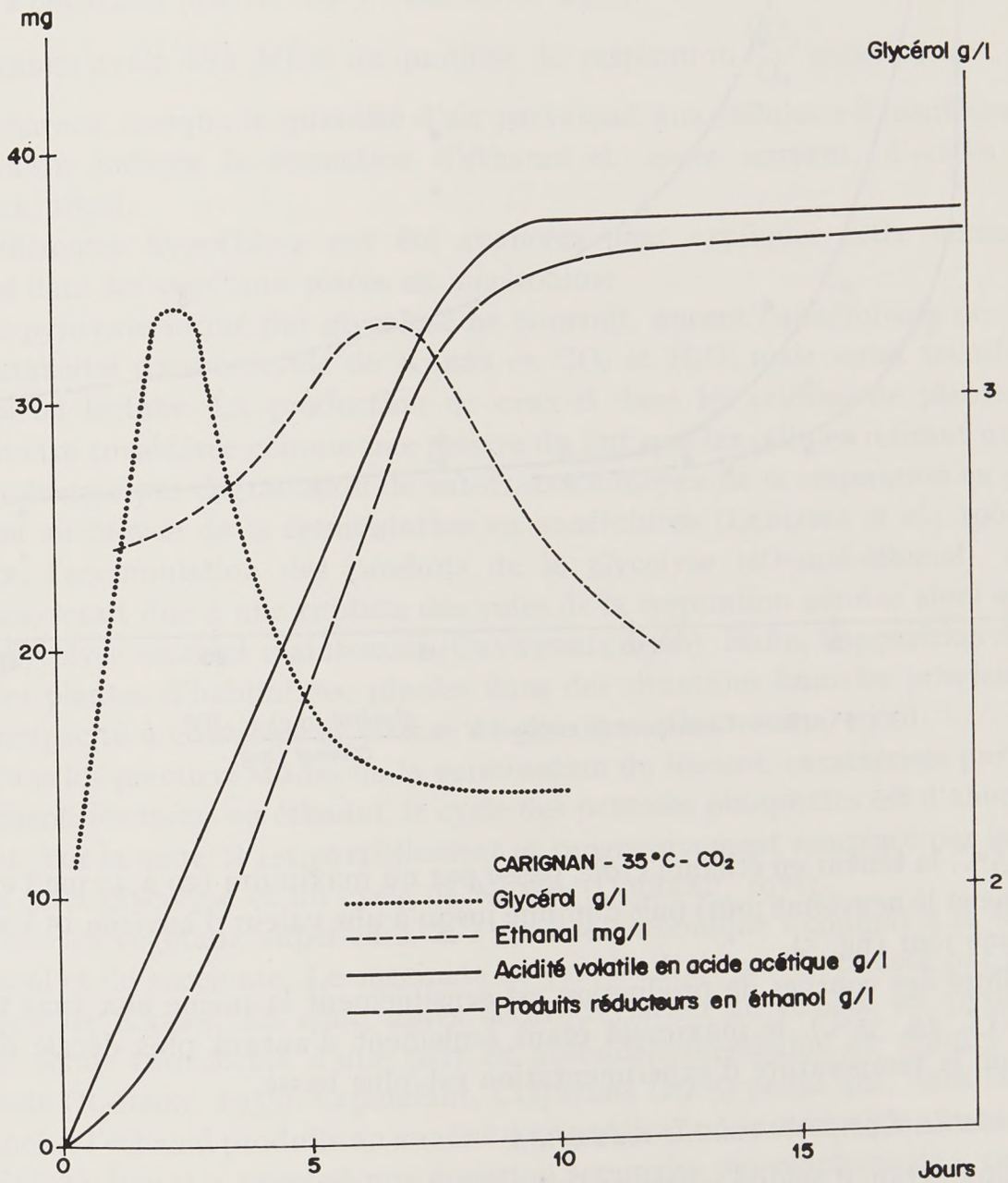


FIG. 5. — *Cinétique de formation de quelques produits secondaires du MA*

Le rapport $\frac{\text{glycérol} \times 100}{\text{éthanol}}$, très élevé dans les premières heures, s'abaisse d'autant plus rapidement que la température est plus élevée. Puis il se stabilise pour une valeur sensiblement égale à 18-20 p. 100. Cette valeur est obtenue pour les trois températures étudiées (fig. 6).

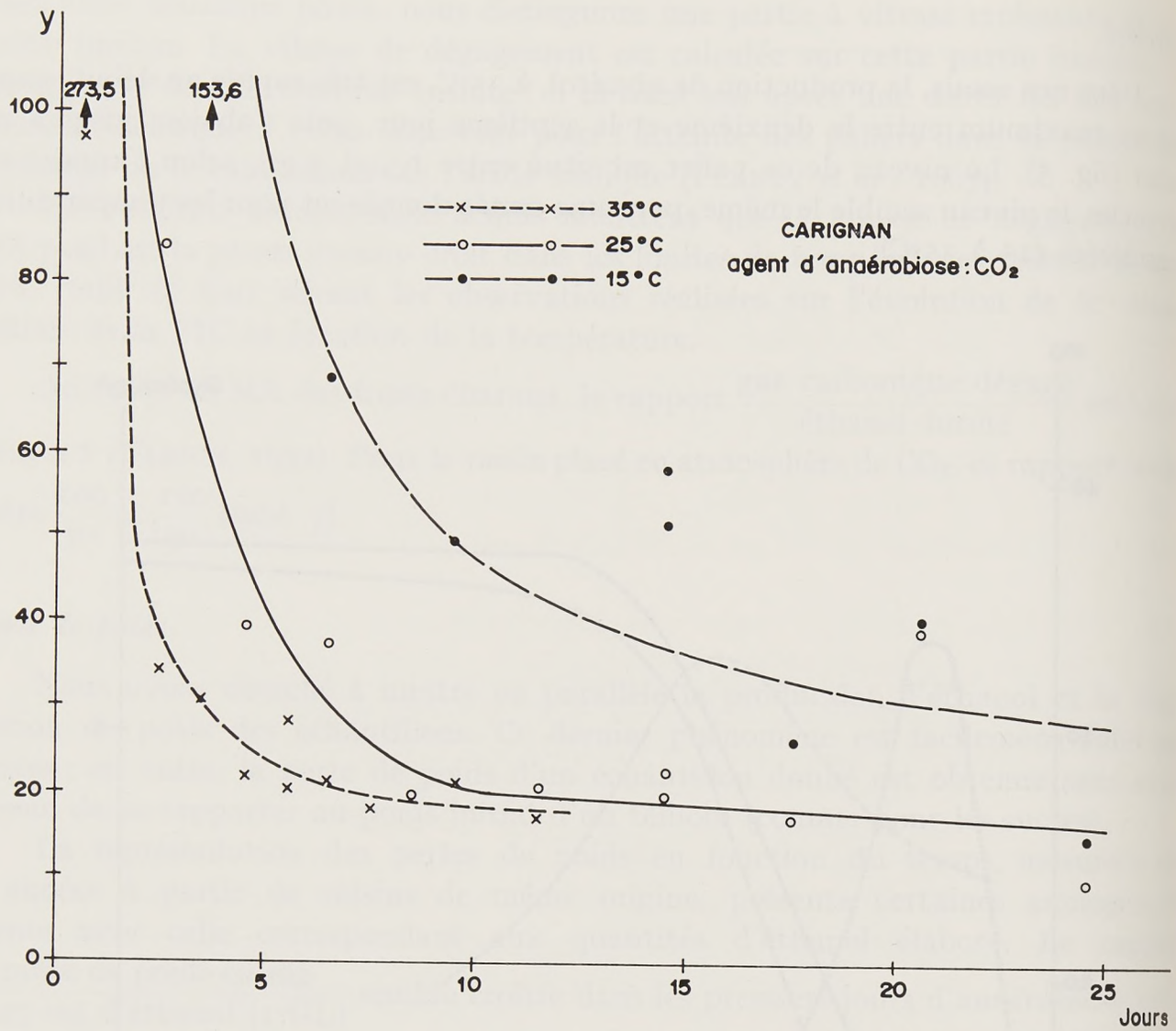


FIG. 6. — *Cinétiques du rapport* $Y = \frac{\text{glycérol (mg)} \times 100}{\text{éthanol (mg)}}$

Éthanol.

A 35°C, la teneur en éthanol croît, passe par un maximum (20 à 40 mg/l entre le cinquième et le neuvième jour) puis diminue jusqu'à une valeur d'environ 15 à 20 mg/l au dixième jour (fig. 5).

L'allure des courbes de production est sensiblement la même aux trois températures (15, 25, 35°C), le maximum étant seulement d'autant plus décalé dans le temps que la température d'expérimentation est plus basse.

Acidité volatile. Composés volatils réducteurs.

La production d'acidité volatile suit la cinétique de formation d'éthanol. A 35°C, le palier est atteint au huitième-dixième jour et correspond à une teneur maximale de 0,7 méq/l (fig. 5).

Il en est de même pour les composés réducteurs retrouvés dans les gaz rejetés des enceintes expérimentales. La quantité de ces corps, exprimés en éthanol, atteint, au palier, 35 mg pour 1 000 g de baies au départ.

Acide succinique.

De l'acide succinique s'accumule au cours du MA des raisins : 2 à 3 méq/l après 10 jours à 35°C (FLANZY *et al.*, 1967).

IV. — CONCLUSIONS

Des raisins placés dans une atmosphère fortement enrichie en CO_2, azote ou argon, subissent le MA qui se manifeste, en particulier, par la production d'éthanol. Cette observation rejoint les données de la littérature relatives à la « fermentation propre » des fruits (Smith, 1963 ; Deysson, 1966).

Gerber avait déjà défini un quotient de respiration $\frac{CO_2}{O_2}$ supérieur à 1, pour les fruits charnus, lorsque la quantité d'air parvenant aux cellules est insuffisante. Une telle valeur indique la formation d'éthanol et, assez souvent, d'acides volatils (Gerber, 1898).

Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer cette accumulation d'alcool dans les végétaux placés en anaérobiose.

Le pyruvate formé par glycolyse ne pourrait, durant l'anaérobiose des plantes, être catabolisé dans le cycle de Krebs en CO_2 et H_2O, mais serait transformé en éthanol ou lactate. La production de ceux-ci dans les cellules de plantes vertes devrait être considérée comme une preuve du fait que les cellules retirent une partie de leur énergie par dégradation de substrats au moyen de la respiration en présence d'air ou au moyen de la fermentation en anaérobiose (Leblova *et al.*, 1969). Pour Fidler, l'accumulation des produits de la glycolyse (éthanol-éthanal), dans les pommes, serait due à une rupture des voies de la respiration aérobie alors que celles de la glycolyse seraient maintenues (Crawford, 1966). Enfin, l'apparition d'éthanol dans les plantes d'habitat sec placées dans des situations humides proviendrait de leur incapacité à contrôler la vitesse de glycolyse (Crawford, 1966).

Dans les premiers stades de la germination du haricot, caractérisés par un enrichissement des tissus en éthanol, le cycle des pentoses phosphates est d'abord prédominant. Par la suite, il est partiellement et progressivement remplacé par la mise en œuvre de la glycolyse et du cycle de Krebs (Doireau, 1971).

Chez les végétaux supérieurs, la « zymase carbonique » conduit à la formation d'éthanol et de succinate. Le succinate ne proviendrait pas du malate par inversion du cycle de Krebs. En effet, après décarboxylation du malate en pyruvate, ce dernier serait transformé d'une part en acétaldéhyde-éthanol et, d'autre part, en succinate (Ranson, 1953). Cependant, Clijsters (1965) pense que, dans la pomme, l'éthanol et l'éthanal produits en anaérobiose auraient une autre origine que le malate.

Fidler (1951) a proposé une équation sommaire des réactions de « respiration anaérobie » de la pomme :

$$n\ C_6H_{12}O_6 + m\ \underset{\text{(acide malique)}}{C_4H_6O_5} \longrightarrow x\ CO_2 + y\ C_2H_5OH$$

Cette équation signifie que les quantités d'alcool et de CO_2 produites sont équivalentes à la somme des quantités d'alcool et de CO_2 pouvant résulter de la fermentation des sucres perdus, augmentée de la quantité de CO_2 pouvant être obtenu par oxydation complète des acides consommés.

« Le fait que x soit supérieur à y est dû à la production de CO_2 par les acides sans

TABLEAU 8

Bilans partiels des quantités de substrats mis en œuvre au cours du MA du raisin

Durée du MA (jours)	Substrats transformés			Bilans		Substrats formés						
	Perte poids 1	Perte sucres 2	Perte malate 3	2 + 3	*4 + 5* (ε 4 à 10)	Éthanol 4	CO_2 5	Glycérol 6	Éthanal 7	Acidité volatile 8	Produits réducteurs 9	Succinate 10
2	3 148	7 362	401	7 763	*7 347* (9 109)	3 440	3 907	1 687	41	12	4	18
5	8 524	16 741	991	17 732	*16 994* (18 805)	7 823	9 171	1 687	28	24	19	53
7	10 680	19 397	213	19 610	*19 959* (23 204)	9 064	10 895	3 067	37	24	28	89
9	11 051	20 814	1 373	22 187	*20 776* (23 838)	9 726	11 050	2 908	29	37	29	59
12	11 753	21 663	1 768	23 431	*20 679* (23 017)	10 123	10 556	2 165	32	24	28	89
16	11 644	20 884	1 748	22 632	*21 937* (24 011)	9 759	12 178	1 840	60	38	36	100

Carignan : MA à 35°C. Agent d'anaérobiose : CO_2. Données exprimées en mg pour 1 000 g de raisins au départ. Composition initiale des baies : sucres : 197 g/l acide malique : 51,2 méq./l. La perte en sucres est calculée sur la base de 17 g de sucres pour 7,936 g d'éthanol. (8) : exprimée en acide acétique. (9) : exprimés en éthanol. (3) et (10) : exprimées respectivement en acide malique et acide succinique.

accompagnement de production d'alcool. » FIDLER ajoute, cependant, que « l'oxydation du malate dans l'azote doit amener la formation de grandes quantités de produits fortement réduits ; la preuve de la production de ces substances n'a pas été faite ».

Les incertitudes sur les déterminations des sucres ne nous permettent pas, pour l'instant, de confirmer nettement le bien fondé de cette équation pour le MA du raisin (tabl. 8). En revanche, il a été prouvé qu'une fraction du malate disparu au cours de l'anaérobiose des baies peut être transformée en éthanol (FLANZY, BURET, CHAMBROY, 1971). Dans la voie métabolique empruntée, une mole de malate donnerait deux moles de CO_2 et une mole d'éthanol.

Ainsi, dans nos conditions expérimentales, l'éthanol formé pourrait provenir de deux voies fonctionnant simultanément : la voie glycolytique, la plus importante (étude en cours) et la voie proposée par RANSON.

Pour HARTMANN (1962), « l'activité décarboxylante croissante de la pulpe de poire n'est sans doute pas sans relation avec la fermentation propre du fruit ». Une série d'expérimentations, actuellement à l'analyse, devrait nous permettre de préciser l'évolution de l'activité de certaines enzymes décarboxylantes (EC 1. 1. 1. 40, EC 4. 1. 1. 1) au cours de la FIC du raisin.

Une analyse plus fine de nos résultats sur la vitesse de dégagement de CO_2 dans les premières heures d'anaérobiose peut montrer que cette vitesse est apparemment constante. Ceci rejoint les observations de LEJEUNE (1960) relatives à la fermentation propre des racines de blé. D'autre part, le « CO_2 excédentaire » du rapport $\frac{CO_2 \text{ dégagé}}{\text{éthanol formé}}$ risque de provenir, à la fois, de décarboxylations d'acides organiques et de la recombinaison d'éthanol dans des réactions secondaires comparables à celles conduisant à la formation d'acétoïne.

Tout comme dans les pommes (FIDLER, 1951), la transformation des hydrates de carbone au cours du MA des raisins est sensiblement identique, quant à la nature et la quantité des produits finaux, à la fermentation alcoolique levurienne.

THOMAS signale que, pour la pomme, la « zymase carbonique » permet d'obtenir un rapport $\frac{\text{éthanol}}{\text{éthanal}} = 2$, en présence d'air. Dans une atmosphère à 100 p. 100 d'azote le rapport est habituellement de 50 (SMITH, 1963). Les valeurs que nous obtenons pour le raisin placé sous gaz carbonique sont nettement supérieures, de l'ordre de 500.

Conformément à nos observations précédentes (FLANZY, ANDRÉ, 1965), la durée d'anaérobiose et la température des raisins jouent sur la cinétique et le niveau de production de l'alcool. L'atteinte de paliers dans cette production traduit-elle une désorganisation cellulaire irréversible due par exemple à une libération des enzymes lysosomales ou correspond-t-elle à des blocages des voies de synthèse de l'éthanol par rétro-inhibition? Ces hypothèses appartiennent à des axes de recherches que nous comptons suivre.

Remarquons, enfin, que l'allure des cinétiques de formation d'éthanol est suffisamment caractéristique pour servir d'indice du stade d'évolution du MA du raisin.

Reçu pour publication en septembre 1974.

REMERCIEMENTS

M. R. TOMASSONE a réalisé l'étude statistique de nos résultats. Nous lui adressons nos vifs remerciements.

SUMMARY

INTRACELLULAR FERMENTATION OF GRAPES DURING ANAEROBIC METABOLISM

The anaerobic metabolism of grapes, placed in atmospheres highly enriched (95-98 p. 100) in CO_2, nitrogen or argon, shows itself, in particular, by ethanol formation. The results given are based on eight years of experimentation. They are evaluations of the main and by-products of intracellular fermentation of grapes.

The evolution kinetics of the substances studied (ethanol, CO_2, ethanal, glycerol, volatile reducing agent compounds, weight loss in the fruits) are given for various temperatures. Temperature has an effect upon the initial speed of alcohol formation and upon the final alcohol concentration in the grapes. The kinetics of ethanol production can be described mathematically. The $\frac{\text{sugars}}{\text{alcohol}}$ yield of the intracellular fermentation is on the same scale as that obtained with the alcoholic yeasts normally used. Relations between the quantities of ethanol and quantities of various by-products appear characteristic of intracellular grape fermentation.

The possibility of the existence of some anabolic processes of ethanol during anaerobic metabolism forms the subject of a discussion.

RESUMEN

FERMENTACION INTRACELULAR DE LAS BAYAS DE UVA DURANTE EL TRANSCURSO DE SU METABOLISMO ANAEROBIO

El metabolismo anaerobio de las bayas de uva situadas en recintos en que reinan atmósferas fuertemente enriquecidas (95 a 98 p. 100) en CO_2, nitrógeno o argón, se pone de manifiesto, en particular, por la formación de etanol. Los resultados presentados se refieren a ocho años de experimenación y corresponden a los balances de los productos principales y secundarios de la fermentación intracelular de las uvas.

Las cinéticas de evolución de los productos estudiados (etanol, CO_2, etanal, glicerol, compuestos volátiles reductores, pérdida de peso de los frutos), son debidamente precisadas para distintas temperaturas. La temperautra influye sobre la velocidad inicial de formación de alcohol y sobre su concentración final en las bayas. La cinética de producción de etanol puede ser descrita en forma matemática. El rendimiento $\frac{\text{azúcares}}{\text{alcohol}}$ de la fermentación intracelular corresponde a la misma magnitud que la obtenida por medio de las levaduras alcohólicas utilizadas habitualmente. Las relaciones entre las cantidades de etanol y — as de los distintos productos secundarios parecen ser características de la fermentación intracelular de la uva.

La eventualidad de la existencia de algunas vías anabólicas del etanol durante el transcurso del metabolismo anaerobio es objeto de una discución.

RIASSUNTO

FERMENTAZIONE INTRACELLULARE DELLE BACCHE D'UVA DURANTE IL LORO METABOLISMO ANAEROBICO

Il metabolismo anaerobico delle bacche d'uva poste in atmosfere fortemente arricchite (da 95 a 98 p. 100) in CO_2, azoto o argo, si manifesta in particolare con la formazione d'etanolo. I risulati presentati sono il frutto di otto anni di esperimenti. Essi corrispondono a dei bilanci dei prodotti principali e secondari della fermentazione intracellulare dell'uva.

Le cinetiche dell' evoluzione dei prodotti studiati (etanolo, CO_2, etanale, glicerolo, composti volatili riduttori, perdita di peso del frutto) sono precisate per diverse temperature. La temperatura influisce sulla velocità iniziale di formazione d'alcool e sulla concentrazione finale nelle bacche. La cinetica di produzione d'etanolo puo' assere descritta sotto una forma matematica. Il rendimento $\frac{\text{zuccheri}}{\text{alcool}}$ della fermentazione intracellulare è dello stesso ordine di grandezza di quello ottenuto con i lieviti alcoolici abitualmente impiegati. Dei rapporti tra le quantità d'etanolo e quelle di diversi prodotti secondari sembrano come delle caratteristiche della fermentazione intracellulare dell'uva.

Oggetto di una discussione è l'eventuale esistenza di alcune vis anaboliche dell'etanolo durante il metabolismo anaerobico.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Bouzigues L., 1953. Contribution à l'étude du dosage du glycérol dans les vins. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 51-63.

Chambroy Y., Ferry P., Flanzy C., 1970. Appareil pour la mesure automatique et l'étude cinétique des échanges d'un gaz à pression et température constantes. *Ann. Technol. agric.*, **19**, 205-216.

Chambroy Y., 1971. Absorption et dégagement de gaz carbonique par des baies de raisins au cours de la fermentation intracellulaire. *C. R. Journées Macération carbonique*, 10-11 février 1971, 62-68.

Circulaire, 1970. Lavage préalable des fruits destinés à la fabrication des jus de raisins. *Ann. Fals. Exp. chim.*, **63**, 29-30.

Clijsters H., 1965. Malic acid metabolism and initiation of the internal breakdown in *Jonathan* apples. *Physiol. Plant.*, **18**, 85-94.

Crawford R. M. M., 1966. The control of anaerobic respiration as a determining factor in the distribution of the genus *senecio*. *J. Ecol.*, **54**, 403-413.

Deysson G., 1966. *Physiologie et biologie des plantes vasculaires*. Première partie : Nutrition et métabolisme, 253. Sedes, Paris.

Doireau P., 1971. Évolution de l'activité de quelques enzymes du catabolisme glucidique en rapport avec l'existence de phénomènes fermentaires au cours de la germination du Haricot. *C. R. Acad. Sc.*, **273**, 741-744.

Fidler J. C. 1951. *A comparison of the aerobic and anaerobic respiration of apples*. *J. exper. Bot.* **2**, 41-64.

Flanzy M., 1935. La vinification des vins rouges. Nouvelle méthode de vinification. *Rev. Vitic.*, **83**, 315-319, 325-329, 341-347.

Flanzy C., André P., 1965. Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 173-178.

Flanzy C., André P., Flanzy M., Chambroy Y., 1967. Variation quantitative des acides organiques stables, non cétoniques, non volatils, dans les baies de raisin placées en anaérobiose carbonique. I. Influence de la température. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 27-34. II. Influence de la durée d'anaérobiose *Ann. Technol. agric.*, **16**, 89-107.

Flanzy M., Benard P., Flanzy C., Schober A., 1969 *a*. Détermination du degré alcoolique de vins et de solutions hydroalcooliques à faibles concentrations en éthanol au moyen du mélange sulfochromique. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 367-374.

Flanzy C., Flanzy M., André P., Chambroy Y., 1969 *b*. Fixation à l'obscurité du $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose. II. Devenir du ^{14}C au cours de la fermentation intracellulaire. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 307-325.

FLANZY C., BURET M., CHAMBROY Y., 1971. Fixation à l'obscurité d'acide malique 3-^{14}C par des baies de raisin placées en anaérobiose. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 49-60.

GERBER M. C., 1898. Recherches sur la maturation des fruits charnus. *Ann. Sci. nat. Botan.*, **4**, 280.

HARTMANN C., 1962. La décarboxylation du pyruvate par les tissus de poire au cours de la maturation du fruit. *Rev. gén. Bot.*, **69**, 26-31.

JAULMES P., 1951. *Analyses des vins.* 2e éd., 386-400, Poulain, Montpellier.

JAULMES P., ESPEZEL , 1951. In : JAULMES P. *Analyse des vins.* 2e éd., 418-422, Poulain, Montpellier.

JOURET C., 1971. Produits principaux et secondaires de la fermentation intracellulaire. *C. R. Journées Macération carbonique*, 10-11 février 1971, 29-36.

LEBLOVÁ S., ZIMÁKOVÁ I., SOFROVÁ D., BARTHOVÁ J., 1969. Occurence of ethanol in pea plants in the course of growther under normal and anaerobic conditions. *Biol. Plant.*, **11**, 417-423.

LEJEUNE, 1960. Sur la cinétique de la production d'alcool au cours de la fermentation propre des racines de blé. *C. R. Acad. Sci.*, **251**, 2081-2082.

MATRUCHOT L., MOLLIARD M., 1903. Recherches sur la fermentation propre. *Rev. gén. Bot.*, **15**, 193-220.

PASTEUR L., 1879. Examen critique d'un écrit posthume de Claude BERNARD sur la fermentation. 100, Gauthier-Villars, Paris.

PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.*, **4**, 161-167.

RANSON, 1953. Zymasis and metabolism of acids in higher plant. *Nature*, London, 252.

SEMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des jus sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Fals. Fraudes*, **19**, 208-226.

SMITH W. H., 1963. In : CHICHESTER C. O., MRAK E. M., STEWART G. F. *Advances in food research*, vol. **12**, 111-127. Academic Press, New York and London.

ULRICH R., 1952. *La vie des fruits*, 185-189. Masson, Paris.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4), 501-533.

MISE AU POINT

LES GLUTÉNINES

J. GUÉGUEN, J. LEFEBVRE et L. PETIT

Station de Biochimie et de Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés au C. E. R. D. I. A., I. N. R. A., 91305 Massy

INTRODUCTION

Osborne a dégagé les notions fondamentales sur la composition des protéines des céréales en mettant en évidence quatre holoprotéines par différence de solubilité. L'extrait salin de farine (NaCl 10 p. 100) contient des albumines et des globulines ; une extraction par le mélange éthanol-eau à 70 p. 100 d'éthanol du résidu insoluble dans la solution saline permet de distinguer deux fractions protéiques :

— une fraction soluble : les prolamines ;

— une fraction insoluble : les glutéiines.

La répartition de ces diverses classes de protéines, variable suivant le type de céréales (tabl. 1), dépend aussi de la variété du grain (tabl. 2).

Les méthodes modernes d'étude ont mis en évidence l'hétérogénéité de ces fractions et la complexité particulière des glutélines et prolamines. L'orientation générale des publications parues durant ces vingt dernières années souligne la nécessité d'identifier les différents constituants de ces deux familles de protéines ; ceci permettra vraisemblablement d'expliquer partiellement leur structure et leurs propriétés mécaniques et d'exploiter au mieux leurs possibilités technologiques.

En ce qui concerne le blé, les chercheurs se sont surtout intéressés jusqu'à présent aux protéines du gluten et plus particulièrement aux gliadines. Pourtant, dès 1923, Sharp et Gortner attribuaient aux gluténines le rôle primordial dans la structure du gluten. Mais, à cause de leur insolubilité dans la plupart des solvants de fractionnement, ces protéines de haut poids moléculaire ($\geqslant$ 1 000 000), riches en ponts disulfures intercaténaires, sont difficiles à étudier. Ceci explique l'orientation générale des études vers celle des gliadines ; en effet, ces protéines sont dispersables dans de nombreux solvants à cause de leur poids moléculaire relativement faible ($\leqslant$ 100 000) et se prêtent dans une certaine mesure aux techniques d'investigation classiques des protéines. Ce retard qu'accuse l'étude des gluténines par rapport à celles des gliadines se comble peu à peu grâce aux progrès récents de nombreux laboratoires dans la connaissance de ces protéines.

TABLEAU I

Composition en protéines des grains de céréales (g p. 100 g de grain)
(d'après BOURDET (1956))

	Blé	Orge	Avoine	Seigle	Riz	Maïs
Albumine	0,4 leucosine	0,3 leucosine	—	0,43 leucosine	1,6 à 3,2 leucosine	—
Globuline	0,6 édestine	1,95 édestine	1,5 avénaline	1,76 édestine	0,5	0,4
Prolamine	4,5 gliadine	4 hordéine	1,25 gliadine	4 gliadine	0,5	5 zéine
Glutéline	4 gluténine	4,5	9,05 avénine	2,44	1,2 à 2 orizénine	3,5

TABLEAU 2

Composition protéique de farine d'origine américaine
(d'après FEILLET (1965))

		Blés tendres (*T. vulgare*)								Blés durs (*T. durum*)	
		Blés « Soft » (farineux)				Blés « Hard » (vitreux)					
		Omar	*Brevor*	*Lucas*	*Trumbull*	*E. triumph*	*Bison*	*Selkirk*	*Conley*	*Lakota*	*Wells*
p. 100 de N total	N non prot.....	4	4,6	2,8	2,9	3,7	2,4	3,6	3,7	4,0	3,5
	N prot.....	96	95,4	97,2	97,1	96,3	97,6	96,4	96,3	96,0	96,5
p. 100 de N protéine	Alb. + Glob. ...	20,0	17,0	19,9	18,7	14,6	13,4	11,9	13,5	12,8	13,2
	Gliadines	49,0	51,7	53,0	49,4	50,4	52,2	53,1	49,7	57,8	63,3
	Gluténines	31,0	31,3	27,1	31,9	35,0	34,4	35,0	36,8	30,2	23,5

Aucune étude bibliographique n'a été faite à ce sujet depuis celles, trop succinctes, de WALL (1964), TRACEY (1967), BIETZ, HUEBNER et WALL (1973), ou celle, exhaustive mais déjà ancienne, de BOURDET (1956). La nécessité d'un tel travail se faisait donc sentir. Nous nous sommes limités à l'étude des publications portant sur les gluténines, postérieures à la mise au point de BOURDET, les travaux antérieurs déjà signalés par cet auteur n'étant repris que dans la mesure où ils sont nécessaires à la compréhension générale de l'exposé.

On peut, à travers les publications que nous avons analysées, juger du rôle important qu'occupent dans les travaux en cours la phase d'isolement des gluténines à partir du gluten et plus encore celle de réduction des ponts disulfures en groupements sulfhydriles. Cette dernière opération, en améliorant la solubilisation de ces protéines et en rendant possible l'utilisation des

méthodes de fractionnement par tamisage moléculaire, échange d'ions, électrophorèse, a conduit à l'étude des différents constituants des gluténines. Aussi, il nous semble utile de consacrer une partie de notre exposé à ces deux phases préliminaires avant d'étudier plus particulièrement la composition des gluténines, leur structure, leur rôle dans la technologie des farines et des pâtes.

I. — ISOLEMENT DES GLUTÉNINES

Certaines méthodes de séparation des gluténines, à l'image de celle d'Osborne, s'appuient sur leur caractère insoluble ; le résidu protéique d'extraction du gluten par des solvants salins puis organiques est alors assimilé aux gluténines. D'autres techniques tentent au contraire, en utilisant un ou plusieurs agents dispersants puissants (urée, détergents), de solubiliser la quasi totalité du matériel protéique du gluten puis d'isoler les gluténines par tamisage moléculaire ou différence de solubilité.

Nous étudierons successivement chacune de ces deux séries de méthodes.

Rappelons pour mémoire le fractionnement des protéines de la farine selon la technique mise en œuvre par Osborne (fig. 1).

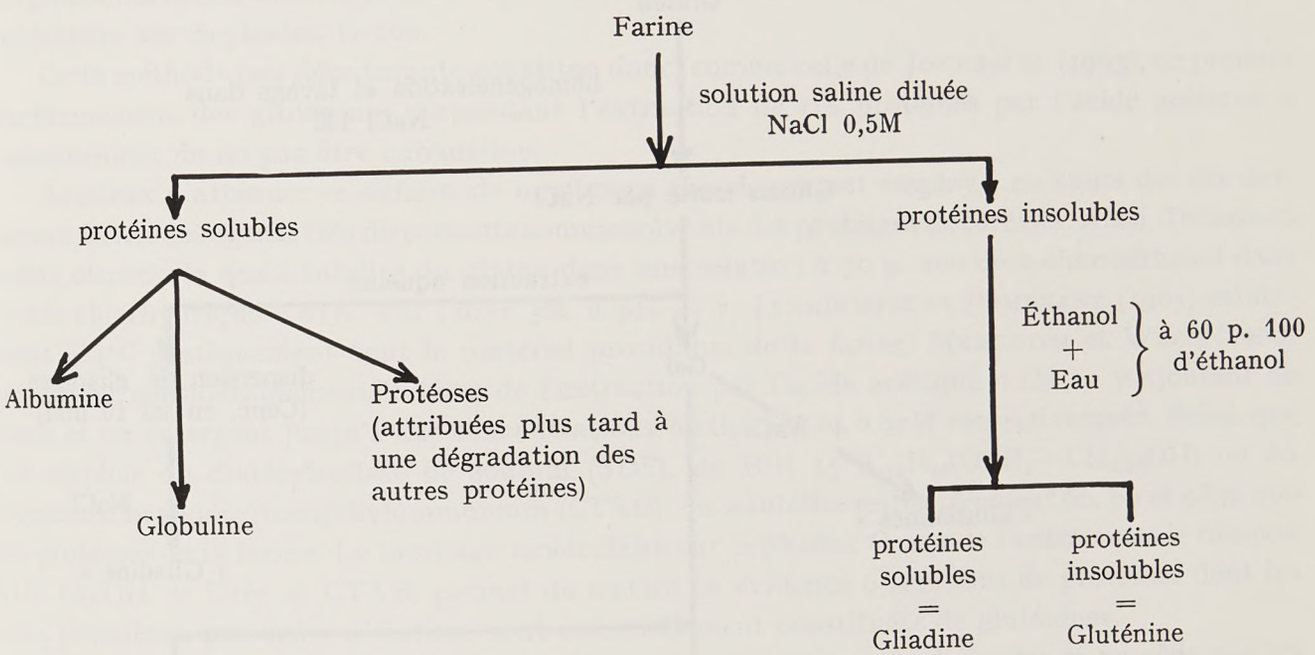


Fig. 1. — *Fractionnement des protéines de la farine selon la technique d'*Osborne

Très précieuse comme base de travail, la classification des protéines de la farine selon Osborne reste imparfaite et appelle les remarques suivantes (Baudet, Mossé, 1962) :

— les protéines appartenant à une classe déterminée sont en partie solubles dans les solvants d'une autre classe ;

— les résultats obtenus sont très variables suivant la technique d'extraction utilisée et suivant l'ordre des solvants.

Aussi, d'autres méthodes utilisant des solvants organiques ou des solutions salines ont été mises en œuvre. De Deken et Mortier (1955) ont étudié la solubilité du gluten dans des mélanges eau-pyridine, eau-dioxane, eau-acétone. Ils ont obtenu une solubilisation de 55 p. 100 des protéines dans le mélange eau-dioxane à 50 p. 100 de dioxane en volume, après 10 minutes d'agitation ménagée. Les pourcentages relatifs des parties solubles (55 p. 100) et insolubles (45 p. 100) ont conduit les auteurs à assimiler chacune de ces fractions aux gliadines et aux gluténines, respectivement. Il semble pourtant que la sélectivité des mélanges eau-dioxane, quel que soit le taux de dioxane, ne soit pas totale et que la fraction « gliadine » contienne des gluténines (Le-

FEBVRE, résultats non publiés). En outre, la solubilisation du gluten est presque totale (80 p. 100) si l'agitation est forte et prolongée. L'étude a montré qu'intervenait alors la rupture de certaines liaisons de faible énergie. La méthode mise en œuvre par CLEMENTS (1973) est également fondée sur le caractère d'insolubilité des gluténines, mais utilise au lieu d'un solvant organique l'action combinée de l'eau et d'une solution saline (NaCl ou $MgCl_2$ 1M) ; elle permet un premier fractionnement de ces protéines.

L'auteur montre que le gluten, après avoir été soumis à une agitation ménagée, dans une solution de chlorure de sodium (1M) peut prendre l'aspect d'un gel lorsque la concentration en sel NaCl est abaissée à la valeur de 5mM. Ce pouvoir de gonflement serait dû à la suppression de liaisons de type ionique ou hydrogène. CLEMENTS pense que l'action de la solution de NaCl 1M briserait, entre autres, certaines liaisons protéines—lipides, et démasquerait ainsi des groupements hydrophiles. L'auteur donne cette explication à la suite des études de FULLINGTON (1963) qui classe les interactions lipides—protéines suivant quatre types : les interactions de type hydrophobe, de type ionique, celles faisant intervenir des liaisons hydrogène et celles dues à la formation d'un complexe avec des ions métalliques.

Le processus d'extraction de CLEMENTS est schématisé par la figure 2.

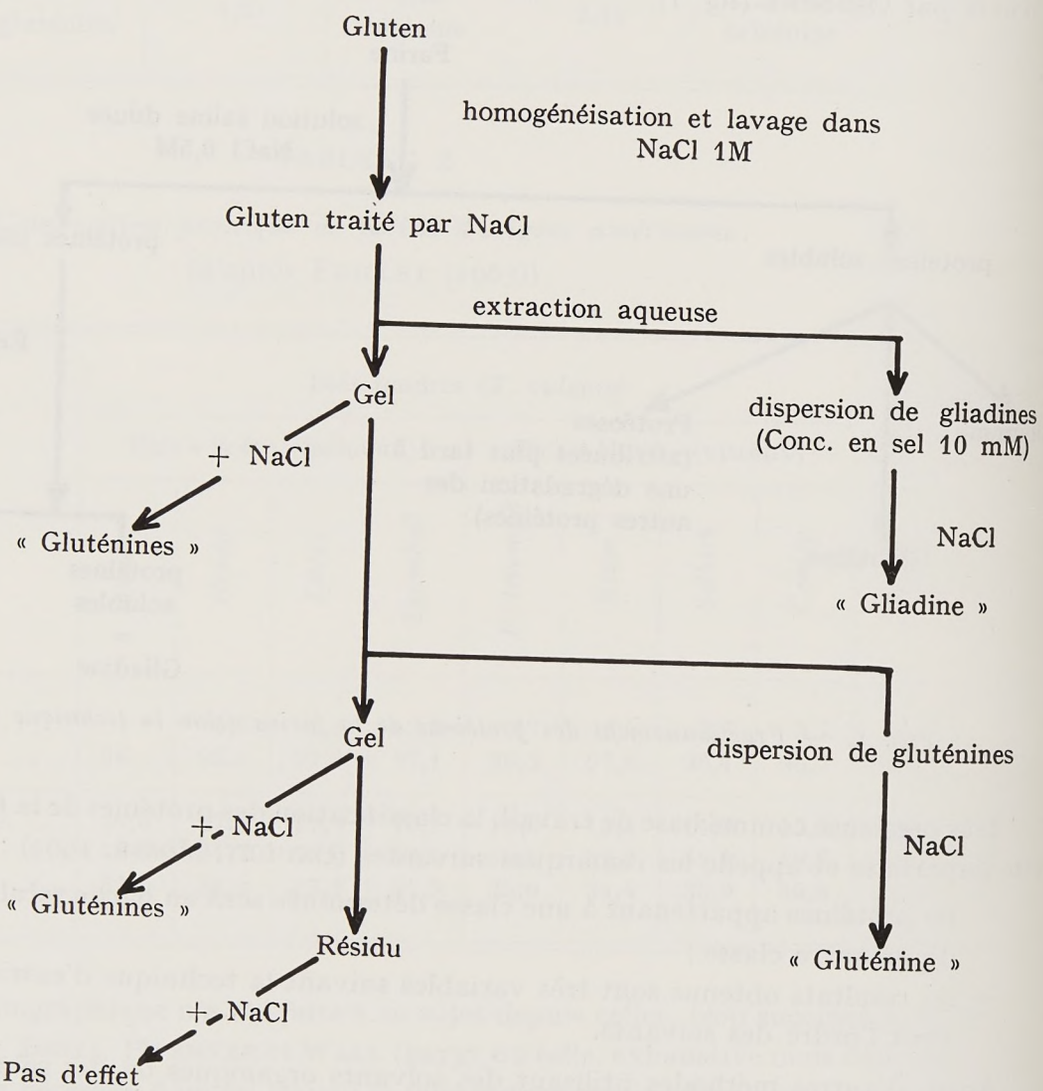


FIG. 2. — *Fractionnement du gluten selon la technique de* CLEMENTS (1973)

Cette méthode semble particulièrement séduisante mais n'est pas encore confirmée. En effet, les isolats n'ont été soumis ni à l'électrophorèse ni au tamisage moléculaire ; on ne connaît donc pas la nature exacte des différentes fractions. Cependant cette technique présenterait l'avantage d'isoler des protéines natives.

L'inconvénient majeur de toutes ces méthodes qui assimilent le résidu d'extraction aux gluténines est la forte contamination du produit par des composés non protéiques insolubles. La contamination serait moindre si l'on séparait les gluténines en les dispersant partiellement ou totalement. Bourdet (1956) signale la solubilité quasi totale des gluténines dans la potasse à 1 p. 100 en volume, ou dans l'acide chlorhydrique 0,1N. Ces solvants présentent peu d'intérêt à cause de leur action dénaturante.

Par contre, l'acide acétique a été souvent retenu. Jones *et al.* (1963) l'utilisent à la concentration de 0,05M et fractionnent l'extrait obtenu à partir du gluten sur Sephadex G-75. Le diagramme d'élution présente alors 6 pics dont les 2 premiers ont pour teneur relative 96 et 86 p. 100 de gluténines. Les études plus récentes d'Ewart (1968 *a*) et de Godon, Richard et Petit (1967) montrent également l'intérêt de l'acide acétique comme agent d'extraction des gluténines à partir du gluten ou de la farine. Le premier auteur fait agir l'acide acétique 0,1M après 2 extractions successives à partir de la farine, l'une par une solution aqueuse de NaCl 0,04M, l'autre par une solution d'éthanol à 70 p. 100. Il solubilise ainsi 24 p. 100 de protéines dont les caractères sont très proches de ceux des gluténines. La seconde méthode utilise le gluten humide et l'acide acétique 0,1M. Dans ces conditions, 20 p. 100 du gluten en poids sec restent insolubles. L'analyse électrophorétique de ce résidu a permis de l'assimiler à une fraction des gluténines. Une autre fraction des gluténines est en effet solubilisée et peut être isolée des autres protéines dispersées par tamisage moléculaire sur Sephadex G-100.

Cette méthode peu dénaturante constitue donc, comme celle de Jones *et al.* (1963), un premier fractionnement des gluténines. Cependant l'extraction de ces protéines par l'acide acétique a l'inconvénient de ne pas être exhaustive.

Soucieux d'atténuer ce défaut, de nombreux chercheurs ont employé, au cours des dix dernières années, des agents très dispersants comme solvants des protéines de céréales. Ainsi, Tschoegl (1961) disperse la quasi totalité du gluten dans une solution à 70 p. 100 de 2-chloroéthanol dans l'acide chlorhydrique 0,01N. Par l'urée 3M, à pH = 7, Jankiewicz et Pomeranz (1965) solubilisent à 4°C pratiquement tout le matériel protidique de la farine. Meredith et Wren (1966) améliorent considérablement le taux de l'extraction par l'acide acétique 0,1M en y ajoutant de l'urée et un détergent jusqu'à des concentrations finales 3M et 0,01M respectivement. Selon que l'on emploie du dodécylsulfate de sodium (SDS), du Brij 35 ($C_{12}H_{25}(OCH_2—CH_2)_{23}OH$) ou du bromure d'hexadécyltriméthylammonium (CTAB), on solubilise respectivement 60, 89 et 98 p. 100 des protéines de la farine. Le tamisage moléculaire sur Sephadex G-200 de l'extrait par le tampon AUC (AcOH + Urée + CTAB) permet de mettre en évidence 6 fractions de protéines dont les deux premières, par ordre d'élution, sont essentiellement constituées de gluténines.

Le Brij est quelquefois préféré au CTAB car il est électriquement neutre et ne gêne pas les études électrophorétiques ultérieures (Orth et Bushuk, 1973). La meilleure solubilisation des protéines en milieu urée ou chlorhydrate de guanidine est attribuée à un déroulement des molécules dans ces solvants, dû à la rupture de certaines liaisons hydrogène intramoléculaires ; mais une action directe de l'urée conduisant à l'affaiblissement des interactions hydrophobes n'est pas à exclure (Yon, 1969). L'action des détergents est différente, il y a formation d'un véritable complexe protéine-détergent. Les techniques qui utilisent ces solvants présentent cependant des inconvénients. En effet, le tamisage moléculaire sépare mal les gliadines de haut poids moléculaire et les gluténines de poids moléculaire faible. En outre, la présence d'urée ou de détergent est toujours gênante et risque de fausser certains dosages (Kjeldahl). Or l'élimination complète de l'urée et des détergents s'obtient difficilement.

C'est également dans le but de solubiliser le maximum d'azote que Baudet et Mossé (1963, 1964) ont fait l'étude des extractions, par l'eau et par les solutions salines, des protéines de la farine de blé. Ils en concluent que le rendement maximum de solubilisation est obtenu par une série d'extractions, d'abord par l'eau (5 extractions successives), puis par une solution saline de Na_2SO_3 à pH = 8 (5 extractions successives), enfin par une solution aqueuse de diéthylène-diamine 0,5M (1 extraction) ; les pourcentages d'azote extrait sont respectivement de 45, 40 et 11 p. 100.

Une analyse ultérieure a montré que les deux derniers extraits — solution de sulfite de sodium et éthylène diamine — pourraient être assimilés aux gluténines d'Osborne. Si cette méthode est satisfaisante par son taux de solubilisation globale (96 p. 100 de l'azote total de la farine) et la spécificité relative des fractions, elle présente l'inconvénient de dénaturer les protéines par l'action réductrice du sulfite de sodium. Car il est vraisemblable que c'est la rupture des liaisons S—S qui permet la solubilisation partielle des gluténines.

Cette grande diversité des méthodes, la multitude des solvants employés soulignent les difficultés rencontrées dans la séparation des gluténines. Le mode opératoire lui-même influe considérablement sur le taux de l'extraction. Ceci est particulièrement bien illustré si l'on compare l'extrait protidique par l'eau obtenu sur la farine par le procédé Maes (1962) avec celui obtenu par le procédé de Mossé et Baudet (1964). L'eau n'extrait que 15 à 18 p. 100 de protéines par percolation de la farine dispersée au sein d'un mélange quartz-ponce (Maes, 1962) tandis que par les 5 extractions successives de Mossé et Baudet elle en solubilise 45 p. 100. Alors que la première technique ne permet d'extraire que les albumines et globulines, la seconde solubilise en outre une partie des gliadines. On comprend alors que sous le même terme de gluténines les divers auteurs puissent regrouper des fractions protéiques du gluten quelque peu différentes. Cette remarque prend toute son importance lorsqu'il s'agit de comparer les résultats obtenus par plusieurs laboratoires. D'ailleurs, certains auteurs préfèrent étudier les protéines des céréales sans référence particulière à la classification d'Osborne, mais simplement par rapport aux systèmes de solvants qu'ils ont choisis.

II. — RÉDUCTION ET BLOCAGE DES GLUTÉNINES

Quelle que soit la technique d'extraction utilisée, les gluténines ne peuvent que difficilement être étudiées sous leur forme native : elles se dissolvent très mal dans les tampons utilisés en électrophorèse et en tamisage moléculaire ; on attribue cette insolubilité à la présence des lipides (Clements, 1973) et surtout des ponts disulfures intercaténaires (Wall, 1964) qui confèrent à ces macromolécules de structure fibrillaire une masse moléculaire très élevée. Bourdet (1956) signale que dès 1936 Balls et Hale avaient observé que l'eau pure additionnée de cystéine dissolvait le gluten et que des corps comme les bisulfites et les cyanures provoquaient sa dégradation immédiate ; ces auteurs avaient mis en évidence la corrélation entre la quasi-liquéfaction du gluten et la libération des groupements —SH qu'ils avaient caractérisés par la réaction colorée au nitroprussiate. Cette observation se trouve à l'origine des méthodes actuelles d'étude des gluténines. En effet la plupart des auteurs travaillent sur les protéines réduites et alkylées qui, de masse moléculaire plus faible, se dispersent relativement bien dans les solvants ioniques. L'alkylation des groupements sulfhydriles formés au cours de la réduction empêche leur réoxydation ultérieure.

La réduction

Les principaux agents réducteurs utilisés sont les puissants réducteurs de la chimie minérale comme les sulfites SO_3^{--} et les cyanures CN^- ou ceux plus spécifiques des ponts disulfures comme les thiols. Pour permettre un déploiement maximum de la molécule et une bonne accessibilité des groupements S—S, le milieu de réaction est en général l'urée (8M ou 6M) ou le chlorhydrate de guanidine (3M ou 6M).

Les réductions par les sulfites et les cyanures suivent les réactions ci-dessous (De Marco, Graziani, Mosti, 1966) :

$$R—S—S—R + SO_3^{--} \rightleftharpoons R—S—SO_3^- + R—S^-$$

$$R—S—S—R + CN^- \rightleftharpoons R—S—CN + R—S^-$$

Étant donné l'utilisation difficile et peu fréquente des cyanures, nous insisterons plus particulièrement sur la sulfitolyse dont la cinétique a été étudiée par Cecil et McPhee (1955). Il s'agit d'après ces auteurs d'une attaque nucléophile du premier ordre dont le paramètre essentiel est le pH. Pour permettre l'ionisation des constituants et augmenter leur réactivité, la réduction doit se faire à un pH $\geqslant$ 6, sa valeur exacte dépendant de la nature des protéines. En général, les auteurs opèrent vers pH = 9,5 sur une dispersion des gluténines en milieu urée 8M en présence d'un excès important de réactif (30 moles de sulfites par pont disulfure). Dans ces conditions la réaction dure 20 minutes (Stevens, 1966).

Il y a plusieurs inconvénients à utiliser les sulfites. D'une part ce type de réducteur exclut l'emploi de N-éthylmaléimide (NEMI) comme agent alkylant des groupements sulfhydriles formés et supprime par conséquent le dosage correspondant. D'autre part, si les S—H ne sont pas bloqués au fur et à mesure de leur formation, la réaction est incomplète puisqu'il s'agit d'un équilibre chimique. En outre, une liaison S—S ne conduit qu'à une seule fonction S—H ; il en résulte une asymétrie entre les composés obtenus. La réduction par les thiols ne présente pas cet inconvénient.

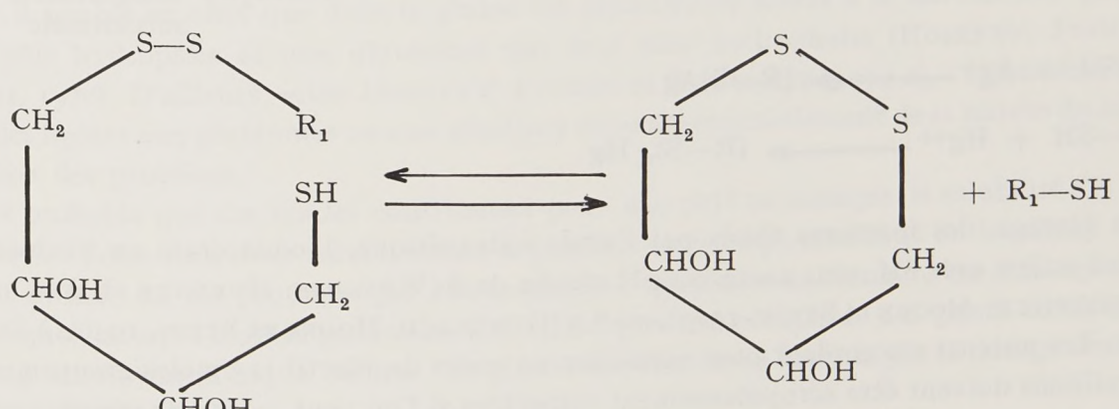
$$R_1—S—S—R_2 + R—S^- \longrightarrow R_1—S—S—R + R_2—S^-$$
$$R_1—S—S—R + R—S^- \longrightarrow R—S—S—R + R_1—S^-$$

Les thiols les plus couramment utilisés sont le 2-mercaptoéthanol $HS—CH_2—CH_2OH$, le dithioérythritol (DTE) $CH_2(SH)—CHOH—CHOH—CH_2(SH)$. L'acide thioglycolique $HS—CH_2—COOH$ ne semble pas avoir été employé pour la réduction des gluténines.

Beckwith et Wall (1966) d'une part, Woychik, Huebner et Dimler (1964) d'autre part, dans une étude où ils utilisent le mercapto-éthanol, suivent pratiquement les mêmes conditions de réaction. Les deux auteurs opèrent sous azote, l'un en milieu urée 6M, l'autre 8M, le premier pendant 15 mn à pH = 7,4, en présence d'un excès de mercaptoéthanol (100 moles par pont S—S), le second pendant 1 heure à pH = 8 avec 50 moles de réactif par pont disulfure. On peut remarquer que dans tous les cas la réduction se fait en présence d'un excès important de thiols, alors que la protection des groupements sulfhydriles d'une protéine contre une oxydation éventuelle se fait par des doses beaucoup plus faibles.

La réduction par le dithioérythritol (DTE) diffère légèrement de la réaction générale des thiols sur les ponts disulfures.

$$R_1—S—S—R_2 + HS—CH_2—CHOH—CHOH—CH_2—SH \longrightarrow$$
$$R_2—SH + R_1—S—S—CH_2—CHOH—CHOH—CH_2SH$$



D'après Cleland (1964) DTE oxydé

Les conditions de réaction sont similaires aux précédentes ; cependant comme le DTE contient 2 groupements —SH réducteurs par molécule, la concentration molaire dans le milieu de réaction est deux fois plus faible que celle du mercaptoéthanol (Zahler, Cleland, 1968). L'emploi de ce réactif comme réducteur des protéines du gluten ne fait l'objet d'aucune publica-

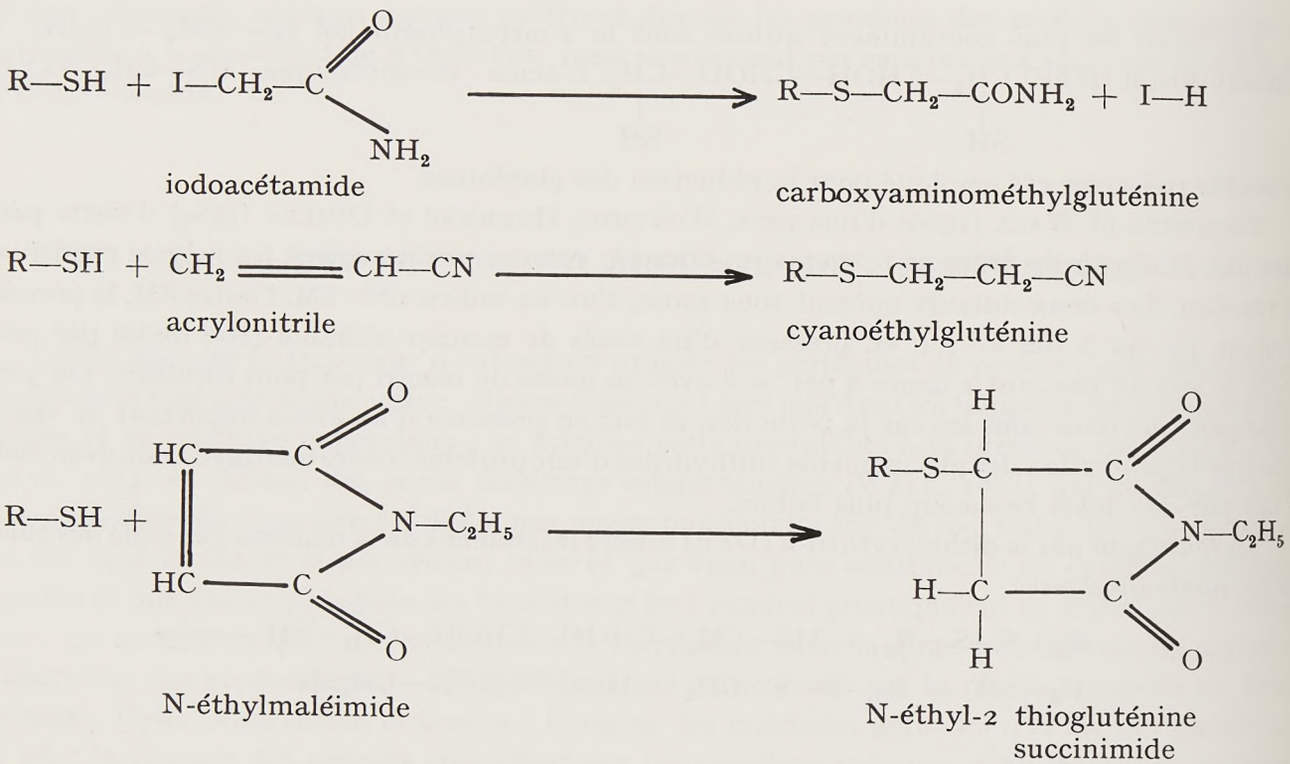
tion. Il a pourtant été utilisé avec succès par LEFEBVRE (résultats non publiés) qui l'a retenu pour son pouvoir de réaction et sa manipulation commode.

Dans l'une ou l'autre de ces techniques de réduction, un paramètre est essentiel : la concentration du milieu réactionnel en urée. BECKWITH et WALL (1966) ont étudié le taux de réduction des gluténines en fonction de la concentration en urée. Si l'agent réducteur est le bisulfite, il apparaît que la concentration minimale en urée à adopter est 6M ; à des concentrations molaires inférieures, l'accessibilité des ponts disulfures est insuffisante pour permettre une réduction totale.

Le blocage

Pour éviter la réoxydation progressive des groupements —SH, on procède, dès que la réduction est terminée, à un blocage par alkylation des groupements sulfhydriles.

Les agents de blocage alkylants sont nombreux et appartiennent à 3 types : les uns contiennent un halogène comme l'iodoacétate ou l'iodoacétamide et donnent avec les groupes sulfhydriles une réaction de substitution, les autres possèdent une double liaison comme l'acrylonitrile ou la N-éthylmaléimide et réagissent par addition. Le troisième type de réaction provoque la formation de mercaptide d'argent ou de mercure.



$$R—SH + Ag^{+} \longrightarrow (R—S)Ag$$

$$2\ R—SH + Hg^{++} \longrightarrow (R—S)_2\ Hg$$

Le blocage des fonctions thiols par l'acide iodoacétique, l'iodoacétate ou l'iodoacétamide se fait en milieu urée 8M, sous azote, au pH alcalin de 8 (WOYCHIK, HUEBNER et DIMLER, 1964), 8,3 (CRESTFIELD, MOORE et STEIN, 1963), ou 8,5 (GUNDLACH, MOORE et STEIN, 1959), à l'abri de la lumière. Les auteurs s'accordent pour conseiller un excès de réactif (25 moles/groupements SH). Ces conditions doivent être scrupuleusement respectées si l'on veut avoir une réaction spécifique des groupements —SH.

Si l'on ne travaille pas à l'abri de la lumière, il y a formation d'iode. Celle-ci peut alors réagir sur les résidus tyrosine, tryptophane et histidine (CRESTFIELD, MOORE et STEIN, 1963). En outre, si le pH est inférieur à 8, la réaction a lieu préférentiellement sur la méthionine et les groupements sulfhydriles ne sont que partiellement alkylés. L'acrylonitrile présente, par rapport à l'iodoacétamide, l'avantage d'être plus spécifique des résidus cystéine (WETL, SEIBLES, 1959). Les condi-

tions de réaction sont les suivantes : milieu urée 6M, pH = 7,5, deux moles d'acrylonitrile par groupement —SH (Stevens, 1966). Plummer et Hirs (1964), qui ont étudié la réaction sur la ribonucléase, en ont déduit qu'à ce pH le taux de réaction de l'acrylonitrile sur les résidus à noyaux imidazole comme l'histidine ou sur les fonctions ε aminées comme celle de la lysine était pratiquement nul. Le principal défaut de la cyanoéthylation est le greffage sur la molécule d'une chaîne latérale S-cyanoéthyl qui introduit une nouvelle charge.

Ce sont les principales méthodes utilisées pour la réduction et le blocage des gluténines. L'alkylation par la N-éthylmaléimide est plutôt employée pour le dosage des ponts disulfures. Nous l'étudierons dans le paragraphe correspondant.

Ces techniques, mises au point sur des protéines mieux connues que celles du gluten, s'appliquent assez bien aux gluténines. Mais alors que, d'après les différentes publications, les meilleurs résultats sont obtenus par le dithioérythritol et l'acrylonitrile, il semble que dans le cas précis des gluténines les auteurs préfèrent utiliser le mercaptoéthanol et l'iodoacétamide. L'objectif recherché, quant à lui, est atteint puisque leur solubilité est satisfaisante après réduction et alkylation.

III. — COMPOSITION DES GLUTÉNINES

Par le terme de gluténines, les auteurs désignent en général la classe de protéines qu'ils assimilent à celle définie par Osborne. Mais, comme nous l'avons déjà signalé, cette classe représente une fraction plus ou moins importante du gluten suivant la technique de séparation. Aussi pour lever toute ambiguïté nous préciserons, chaque fois que cela nous sera possible, le processus d'obtention de ces protéines. En outre, lorsque cette classe protéique est obtenue comme résidu d'extraction, des glucides et des lipides se trouvent, à l'état libre ou lié, associés aux gluténines. Il nous semble intéressant d'en préciser rapidement la nature d'autant que l'on attribue à ces constituants non protéiques un rôle important dans la structure même du gluten.

Aucune étude particulière n'a été faite sur les glucides isolés en même temps que les gluténines. Cependant on peut penser qu'il s'agit de longues chaînes glucidiques s'apparentant peut-être aux pentosanes du gluten étudié par D'Appolonia et Gilles (1971). La nature des lipides est mieux connue, elle a été précisée par les études de Ponte, De Stephanis et Cotton (1967) (tabl. 3 et 4) qui montrent, en accord avec les travaux d'Hoseney, Finney et Pomeranz (1970 *a* et *b*), que les lipides associés aux gluténines sont surtout des triglycérides non polaires alors que ceux combinés aux gliadines sont essentiellement des glycolipides. Mais cette répartition n'a rien d'absolu ; il semble en effet que dans le gluten les glycolipides soient à la fois liés aux gliadines par leur pôle hydrophile et aux gluténines par leur pôle hydrophobe (Hoseney, Finney et Pomeranz, 1970). D'ailleurs, selon Hoseney, Finney et Pomeranz (1970 *a*), l'association préférentielle des lipides aux gluténines ou aux gliadines dépend essentiellement de la nature du solvant d'extraction des protéines.

Il est probable que ces lipides contribuent pour une part au manque de solubilité des gluténines natives. Cette mauvaise solubilisation a pendant longtemps constitué un handicap important pour l'étude de ces protéines par électrophorèse, tamisage moléculaire ou échange d'ions. C'est pourquoi, avant l'emploi généralisé des techniques de réduction des ponts disulfures, la seule composition biochimique connue des gluténines était celle fournie par le dosage des acides aminés de la fraction totale.

Ces dosages, s'ils ne nous renseignent pas sur la composition fine des gluténines, ont permis cependant de différencier ces protéines des gliadines. En particulier, comme le souligne le tableau 5, la gluténine est plus riche en acides aminés basiques, ceci lui confère un caractère ionique marqué en milieu acide. La gliadine par contre possède un taux plus élevé de proline, isoleucine, phénylalanine et cystéine. Les teneurs sont sensiblement les mêmes en tyrosine, alanine, thréonine, sérine et acide aspartique.

TABLEAU 3

Composition lipidique de fractions du gluten
(d'après PONTE, DE STEFANIS et COTTON (1967))

	Technique d'obtention	p. 100 du gluten en matière sèche	p. 100 de protéines (N × 5,7)	Lipides en p. 100 de matière sèche	Rapport protéines/lipides
Isolat de gluténines	résidu d'extraction (éthanol + AcOH)	16,6	49,2	6,9	7,1
Isolat de gluténines	solubles dans AcOH 0,05N	41,1	80,0	6,7	11,9
Isolat de gliadines	solubles dans éthanol 70 p. 100	42,3	73,6	9,1	8,1

TABLEAU 4

Nature des lipides associés à certaines fractions du gluten
(d'après PONTE, DE STEFANIS et COTTON (1967))

Technique d'obtention	Gluten	Isolat de gluténines	Isolat de gluténines	Isolat de gliadines
		Résidu des extractions par éthanol + AcOH	Solubles dans AcOH 0,05N	Solubles dans éthanol 70 p. 100
p. 100 du gluten en m.s.	100	16,6	41,1	42,3
p. 100 de protéines (N × 5,7)	78,7	49,2	80,0	73,6
Lipides polaires	51	44	24	75
Diglycérides	5	12	6	6
Acides gras	7	13	11	12
Triglycérides	36	30	58	6
Lipides non polaires	1	2	2	1

Les valeurs citées dans le tableau 5 ne sont que relatives, car les teneurs en acides aminés varient avec les conditions culturales et la variété du blé (tabl. 6). Cependant les conditions culturales ont surtout une incidence sur la composition protidique globale du grain ; FEILLET (1965) montre que par exemple la variété de blé dur *Montferrier* voit son taux de gluténine s'accroître de 50 et 38 p. 100 à la suite d'une période de sécheresse ou d'un apport tardif d'azote respectivement.

TABLEAU 5

Composition en acides aminés des gluténines et des gliadines

Auteurs	Feillet (1965)				Mossé et Baudet (1964)				Ewart (1967)			
Variétés	*E. Triumph*				*Vilmorin 23*				*Wichita*			
Solvant d'extraction	GMC		Éthanol 60 p. 100		Résidu d'extraction par l'éthylène diamine		3e extraction du gluten par l'eau		AcOH 0,05N		Éthanol 70 p. 100	
Nature des protéines	Gluténines		Gliadines		Gluténines		Gliadines		Gluténines		Gliadines	
N par rapport à l'azote total du gluten (%)	38,9		60,3		7,5		7,5		32,7		22,9	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Ac. aspartique. .	4,94	48,1	2,46	24,5	6,10	58,0	2,71	27	3,77	37,2	2.80	28,0
Thréonine.	3,46	37,5	2,16	24,1	3,85	16,3	2,03	22,5	2,91	32,1	2,02	22,5
Sérine	5,57	68,6	4,43	56,1	5,43	57	4,26	54,0	5,18	64,7	4,89	62,0
Ac. glutamique .	30,79	270,8	42,75	387,2	25,93	254	39,86	362	33,60	300,3	39,07	354,1
Proline.	9,40	105,7	13,74	159,0	8,15	95	13,28	154	10,21	116,5	13,33	154,3
Glycine	4,83	83,3	2,16	38,2	5,10	95	1,74	30,5	4,03	70,5	1,57	27,8
Alanine	3,88	56,3	2,07	30,9	4,19	58	2,23	32,5	2,77	40,9	2,08	31,0
Valine	5.00	55,2	3,84	43,6	4,86	52	3,97	45	4,27	47,9	4,23	48,1
Cystéine	—	—	—	—	1,58	16,0	2,32	25,5	2,28	24,7	2,64	28,9
Méthionine	1,68	14,5	1,42	12,6	1,24	12,5	1,55	13,8	1,64	14,3	1,27	11,3
Isoleucine	3,99	39,4	3,94	39,9	3,96	38,5	4,85	44,5	3,67	36,7	4,22	42,8
Leucine	7,56	74,6	6,70	67,9	6,68	80	7,08	73	6,47	64,8	7,01	71,2
Tyrosine	4,20	30,0	3,15	23,1	4,30	34,5	2,81	20,5	3,78	27,4	3,03	22,2
Phénylalanine . .	4,83	37,8	5,61	45,2	5,10	37,5	5,33	43,5	4,84	38,5	5,47	44,1
Tryptophane . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	1,90	12,2	0,73	4,8
Lysine	3,31	29,2	0,88	8,0	5,21	39	0,87	8,0	2,51	22,5	0,78	7,1
Histidine	2,10	16,7	2,16	18,5	2,37	18,7	2,23	18,9	2,16	18,3	2,17	18,5
Arginine	4,30	31,8	2,75	20,9	5,89	37,5	2,81	22,0	4,01	30,2	2,70	20,6

(1) Résultats exprimés en g d'acides aminés pour 100 g d'acides aminés retrouvés.
(2) Résultats exprimés en nombre de résidus pour 1000 résidus retrouvés.

TABLEAU 6

Composition en acides aminés des gluténines de différentes variétés de blé, solubles dans l'acide acétique 0,05N

(d'après EWART (1967))

	Wichita		*Conley*		*Cappelle*		*Elite*		Moyenne	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Ac. aspartique	3,77	37,2	3,73	36,7	3,46	35,6	3,98	39,4	3,73	37,2
Thréonine	2,91	32,1	3,34	36,7	2,96	32,7	3,22	35,5	3,11	34,2
Sérine	5,18	64,7	5,90	73,5	5,14	64,5	5,29	69,8	5,38	68,1
Ac. glutamique	33,60	300,3	33,96	297,0	34,86	312,5	30,79	275,7	33,15	296,3
Proline	10,21	116,5	10,49	119,2	10,74	122,9	9,71	111,1	10,29	117,4
Glycine	4,03	70,5	3,98	69,4	3,42	60,0	3,86	67,7	3,82	66,9
Alanine	2,77	40,9	2,79	41,0	2,61	38,6	2,91	42,9	2,77	40,8
Valine	4,27	47,8	4,13	46,1	4,07	45,7	4,48	50,3	4,24	47,4
Cystéine	2,28	24,7	2,32	25,0	2,31	25,0	2,57	27,9	2,37	25,6
Méthionine	1,64	14,3	1,63	14,3	1,59	14,0	1,76	15,5	1,66	14,5
Isoleucine	3,67	36,7	3,60	35,9	3,93	39,4	3,74	37,5	3,74	37,3
Leucine	6,47	64,8	6,48	64,1	6,59	66,2	6,76	67,8	6,58	65,8
Tyrosine	3,78	27,4	3,58	25,8	3,35	24,3	3,74	27,1	3,61	26,1
Phénylalanine	4,84	38,5	4,30	34,0	5,31	42,3	4,59	36,5	4,76	37,8
Tryptophane	1,90	12,2	2,18	13,8	1,53	9,7	2,75	17,6	2,09	13,3
Lysine	2,51	22,5	2,02	18,1	1,96	17,7	2,53	22,6	2,26	20,2
Histidine.....	2,16	18,3	2,25	19,0	2,20	18,6	2,68	22,6	2,32	19,6
Arginine	4,01	30,2	3,92	29,4	3,97	29,9	4,63	34,9	4,13	31,1

(1) Résultats exprimés en g d'acides aminés pour 100 g d'acides aminés retrouvés.
(2) Résultats exprimés en nombre de résidus pour 1000 résidus retrouvés.

Les travaux actuels, dont l'un des buts est de fractionner les gluténines, s'orientent vers l'étude des protéines réduites dont la masse moléculaire moyenne plus faible et la dispersibilité satisfaisante permettent d'utiliser la filtration sur gel et l'électrophorèse. En effet, les premiers essais en gel d'amidon ont montré que les gluténines sous leur forme native ne migraient pas.

Les principales techniques d'électrophorèse employées sont l'électrophorèse en gel d'amidon ou en gel de polyacrylamide-sodium dodécylsulfate (SDS) et l'immunoélectrophorèse. L'intérêt des diagrammes électrophorétiques est double ; d'une part, ils permettent de dénombrer et de caractériser les constituants des gluténines, d'autre part ils servent souvent de critère de validité à une méthode de séparation ou de fractionnement.

WOYCHIK, HUEBNER et DIMLER (1964) montrent que la gluténine réduite, obtenue par la méthode de JONES *et al.* (1959), se résout par électrophorèse en gel d'amidon en une vingtaine de constituants dont les principaux sont représentés sur la figure 3. Nombre d'entre eux ne sont présents qu'à l'état de traces. Les auteurs remarquent également que certains de ceux-ci migrent plus loin que les composés les plus rapides des gliadines. Ils les assimilent à des protéines solubles dans l'eau, libérées par la destruction de la structure des gluténines. Ces résultats ont été confirmés par BIETZ et WALL (1972) en gel de polyacrylamide SDS. Ces auteurs distinguent une quinzaine de bandes. L'étalonnage du diagramme électrophorétique par des protéines connues leur a permis d'évaluer le poids moléculaire des protéines séparées (fig. 4).

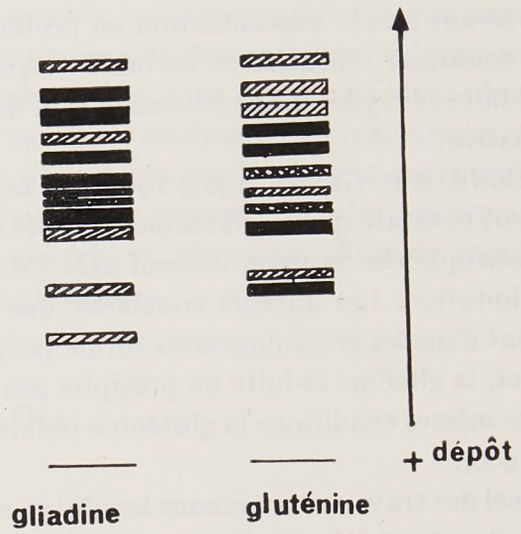


FIG. 3. — *Électrophorèse en gel d'amidon des gluténines après réduction*
Tampon lactate d'aluminium pH : 3,1
(d'après WOYCHIK, HUEBNER et DIMLER (1964))

Ces études, faites pour la plupart en parallèle sur la gluténine et la gliadine, soulignent la similitude de certaines bandes dans les diagrammes électrophorétiques de ces deux classes protéiques après réduction (WOYCHIK, HUEBNER, DIMLER, 1964). BIETZ et WALL (1972) signalent que les bandes 8, 9 et 11 (fig. 4) correspondent par leur poids moléculaire à des bandes de gliadines.

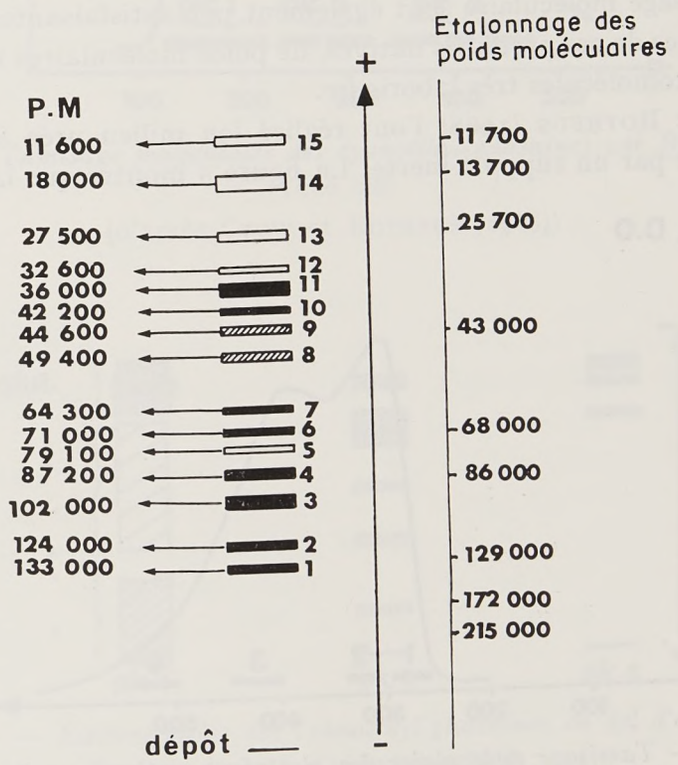


FIG. 4. — *Électrophorèse en gel de polyacrylamide SDS des gluténines après réduction*
Tampon trisborate pH : 8,9
(d'après BIETZ et WALL (1972))

ELTON et EWART (1966) confirment ces résultats mais pensent qu'il s'agit de chaînes de gliadines emprisonnées dans le réseau des gluténines et libérées par la réduction. De toute façon, ces résultats ne suffisent pas pour affirmer que gliadines et gluténines contiennent des chaînes identiques ; car deux constituants de même mobilité électrophorétique peuvent être différents, d'autant que BECKWITH et WALL (1966) remarquent que le produit résultant de la réoxydation des glu-

ténines réduites, en urée 3M saturée en oxygène, ressemble par sa structure et sa viscosité aux gliadines et aux gluténines suivant que la concentration en protéine dans le milieu est de 0,1 ou de 5 p. 100. Ceci semblerait confirmer l'identité de certaines séquences, si le diagramme électrophorétique de la gluténine réduite réoxydée à une concentration de 0,1 p. 100 n'était en fait différent de celui de la gliadine native.

Escribano, Grabar et Benhamou-Glynn (1965, 1966) ont tenté de résoudre le problème par l'immunoélectrophorèse. Ils ont constaté que la gluténine dissoute en tampon phosphate pH = 7, urée 3M, donne en immunoélectrophorèse tampon véronal-urée 3M, en présence d'un immunsérum antigliadine, un arc de précipitation. Les auteurs concluent que certaines séquences présentes dans les gliadines se retrouvent dans les gluténines sous forme polymérisée. Mais cette hypothèse n'a pu être confirmée. En effet, la gliadine réduite ne précipite pas en présence d'un immunsérum antigliadine, alors que dans les mêmes conditions la gluténine réduite présente un arc de précipitation (Escribano, Grabar, 1966).

Il semble, dans l'état actuel des travaux concernant les gluténines, que les techniques d'immunoélectrophorèse soient mal adaptées à l'étude de ces protéines. En effet, ces méthodes fines ne donnent des résultats faciles à interpréter que pour des composés purifiés. Or, les gluténines ne sont jamais totalement débarrassées de constituants de type gliadines. Par conséquent, l'immunoélectrophorèse ne permet pas de vérifier l'hypothèse concernant l'identité de certaines séquences de gliadines et de gluténines.

Aussi divers essais de fractionnement des gluténines natives ont été tentés. Comme nous l'avons vu à propos des méthodes d'isolement des gluténines, certaines techniques, qui utilisent par exemple comme solvant l'acide acétique 0,01M ou l'urée à diverses concentrations, permettent déjà un fractionnement par différence de solubilité. Mais ces méthodes ont une efficacité limitée. Les tentatives de tamisage moléculaire sont également peu satisfaisantes. En effet, l'insolubilité dans les solvants ioniques de ces protéines natives, de poids moléculaires très élevés, rend la filtration sur gel de ces macromolécules très laborieuse.

Pourtant Crow et Rothfus (1968) l'ont réalisé (en milieu urée 8M) sur une colonne de Bio-Gel P 300 stabilisée par un support inerte. La figure 5 montre que la résolution est faible.

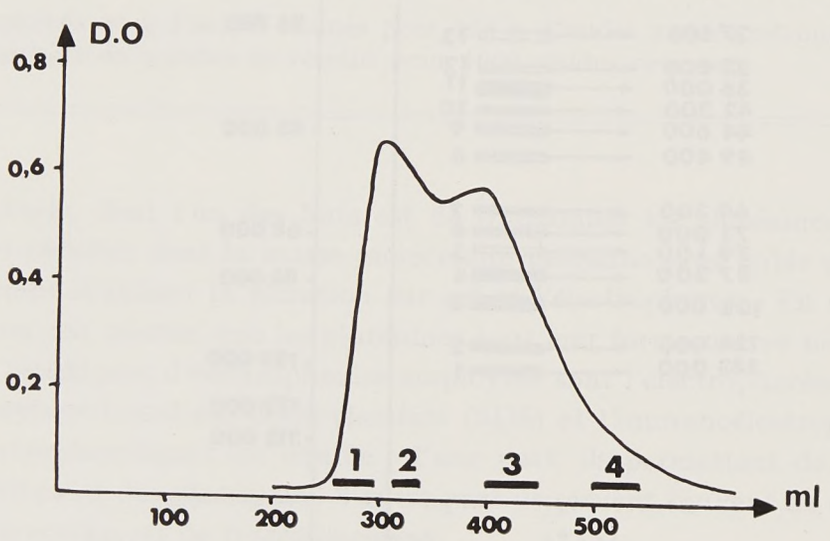


Fig. 5. — *Tamisage moléculaire des gluténines natives sur Bio-gel* P_{300}
Urée 8M
(d'après Crow et Rothfus (1968))

Des échantillons prélevés tout au long de l'élution des protéines ont été soumis à une électrophorèse en gel d'amidon après réduction et alkylation par l'acrylonitrile. Peu de différences apparaissent dans la composition de ces fractions qui ont toutes un diagramme électrophorétique similaire à celui obtenu par Woychik *et al.* (1972) dans le cas de la gluténine totale réduite et alkylée (fig. 3). L'uniformité des diagrammes électrophorétiques des échantillons réduits, associée aux différences des volumes d'élution de ces mêmes protéines sous leur forme native, a conduit Crow et

Rothfus (1968) à penser que les diverses chaînes de gluténine ne se distinguent que par la fréquence de certaines séquences d'acides aminés. Ces auteurs ont obtenus une meilleure résolution en poursuivant leurs études par le fractionnement des protéines réduites et alkylées. Les conditions du tamisage moléculaire sont les mêmes que dans le cas précédent ; le diagramme d'élution permet alors de distinguer trois pics (fig. 6). L'analyse électrophorétique de ces trois fractions met en évidence la particularité du pic n° 3. Alors que le pic n° 1 est constitué de composés mal séparés électrophorétiquement, et que le pic n° 2 regroupe tous les constituants des cyanoéthylgluténines (fig. 7), le pic n° 3 est au contraire très enrichi en protéines de grande mobilité électrophorétique que l'auteur appelle alpha-CN-gluténines.

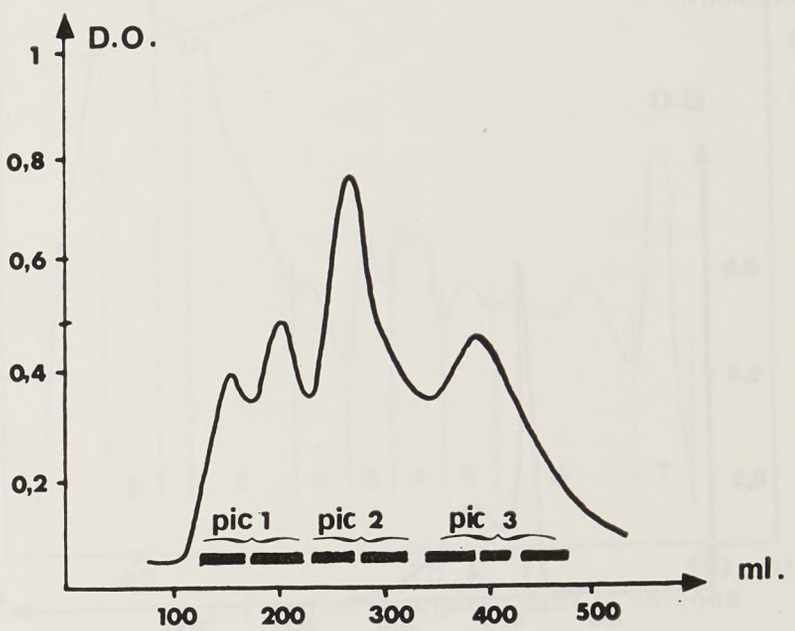


Fig. 6. — *Tamisage moléculaire des cyanoéthyl-gluténines sur Bio-gel P_{300}*
Urée 8M
(d'après Crow et Rothfus (1968))

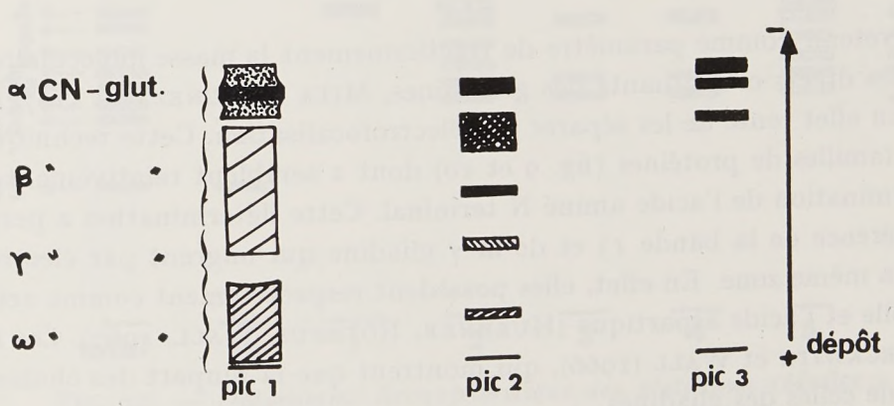


Fig. 7. — *Électrophorèse des cyanoéthyl-gluténines en gel d'amidon*
Tampon lactate d'aluminium pH : 3,1
(d'après Crow et Rothfus (1968))

Huebner et Rothfus (1971) ont fractionné les gluténines sur Bio-Gel A 5m en milieu urée 3M, tris-(hydroxyméthyl) aminométhane 0,06M. La solubilisation des protéines natives dans ce milieu a été obtenue par traitement aux ultra-sons de la dispersion. Le diagramme d'élution obtenu diffère de celui résultant du tamisage moléculaire des gluténines réduites. En effet, on ne peut distinguer dans le cas présent que 2 pics (fig. 8). L'analyse électrophorétique de ces pics après réduction a permis aux auteurs de constater une différence entre les diagrammes des protéines

traitées aux ultra-sons et réduites, et ceux des gluténines simplement réduites. En effet, les bandes de faible mobilité sont absentes dans le diagramme électrophorétique du pic n° 1 relatif aux gluténines ultrasonnées. L'interprétation de ce résultat est délicate, on ne sait pas si la solubilisation est due à une simple désagrégation causée par une agitation importante au niveau moléculaire, ou si le traitement apporte suffisamment d'énergie pour permettre la rupture des liaisons covalentes. Godon et Petit (1968), dans leur étude de l'action des ultra-sons sur le gluten, semblent plutôt retenir la première hypothèse ; ils pensent qu'il y a dépolymérisation par rupture des plus gros agrégats de la fraction gluténine. Le fractionnement effectué par Huebner et Rothfus (1971) a permis cependant d'évaluer le poids moléculaire des gluténines traitées aux ultra-sons. Les pics n° 1 et n° 2 (fig. 8) correspondent à des molécules de poids moléculaire de 2 millions et 1 million respectivement.

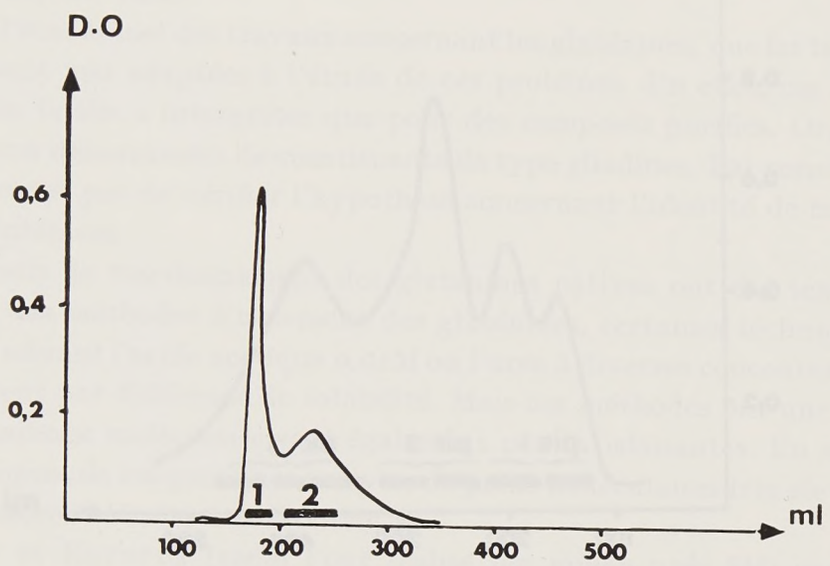


Fig. 8. — *Tamisage moléculaire de gluténines traitées aux ultra-sons, sur Bio-gel A 5m*
Urée 3M. Tampon tris 0,016M
(d'après Huebner et Rothfus (1971))

Au lieu de retenir comme paramètre de fractionnement la masse moléculaire et l'encombrement stérique des divers constituants des gluténines, Mita et Yonezawa (1971) ont choisi leur charge. Ils ont en effet tenté de les séparer par électrofocalisation. Cette technique leur a permis de distinguer 8 familles de protéines (fig. 9 et 10) dont 2 semblent relativement pures si l'on se réfère à la détermination de l'acide aminé N terminal. Cette détermination a permis en outre de souligner la différence de la bande 13 et de la γ gliadine qui migrent par électrophorèse en gel d'amidon dans la même zone. En effet, elles possèdent respectivement comme acide aminé N terminal le glycocolle et l'acide aspartique (Huebner, Rothfus, Wall, 1967). Ces résultats confirment ceux de Beckwith et Wall (1966), qui montrent que la plupart des chaînes de gluténines sont différentes de celles des gliadines.

Ces études d'électrophorèse et de filtration sur gel d'électrofocalisation soulignent la grande complexité des gluténines et la difficulté d'isoler les différents constituants, en raison de la similitude à la fois des charges et des masses moléculaires des composés. Ces travaux ont également permis de comparer gliadines et gluténines et de remarquer que certains composés de ces deux classes protéiques migrent dans la même zone après réduction.

Par l'étude des séquences peptidiques isolées à partir d'hydrolysats enzymatiques des gliadines et des gluténines, Bietz et Rothfus (1970, 1971) d'une part, Ewart (1966) d'autre part ont tenté de mettre en évidence par chromatographie sur couche mince certaines similitudes dans la composition de ces 2 familles de protéines. Les chromatogrammes obtenus ont un nombre important de taches semblables quand l'hydrolyse est faite par la papaïne à pH = 6, à 37°C

pendant 48 heures (Bietz, Rothfus, 1971). La comparaison est plus difficile quand l'enzyme utilisée est la pepsine ou la chymotrypsine. Ceci s'explique par le fait que la papaïne attaque plus de liaisons.

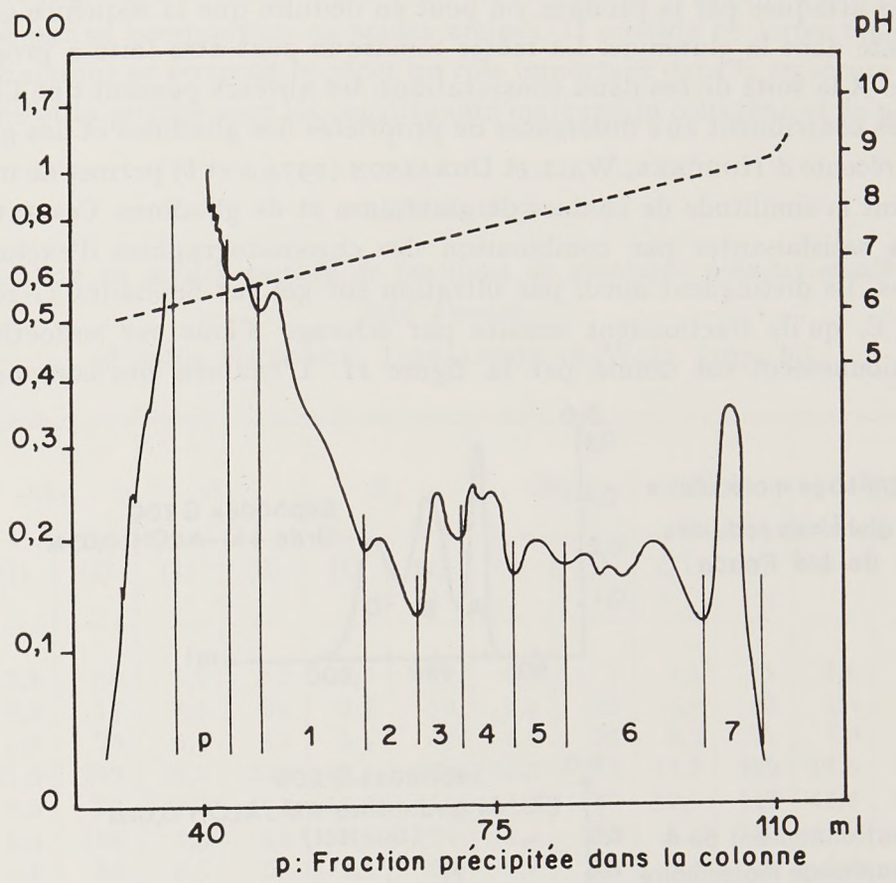


Fig. 9. — *Isoélectrofocalisation de gluténines réduites* (pH 3-10)
(d'après Mita et Yonezawa (1972))

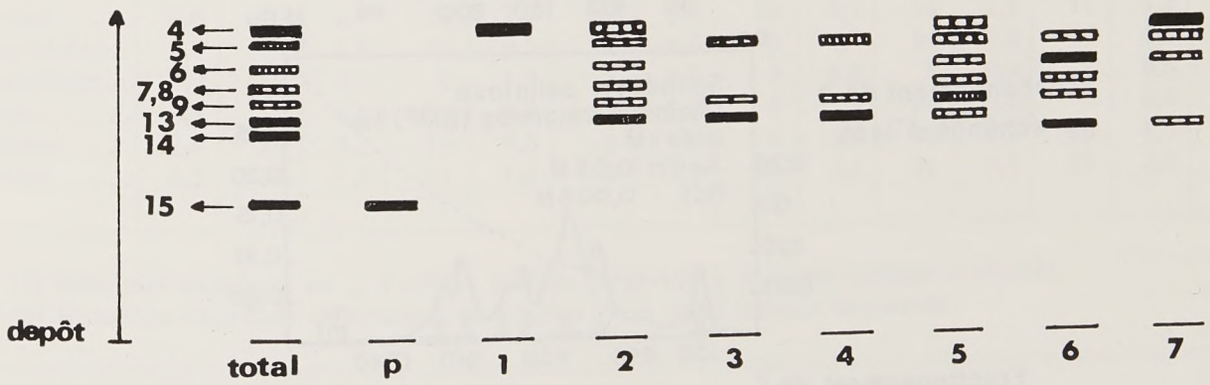


Fig. 10. — *Diagramme électrophorétique des gluténines réduites et des fractions obtenues par isoélectrofocalisation*
(d'après Mita et Yonezawa (1972))

L'étude plus précise de Bietz et Rothfus (1971), effectuée sur la digestion enzymatique par la pronase, fait apparaître l'identité des peptides suivants entre la gliadine et la gluténine :

Glutamine—Glutamine
Glx—Proline
Glx—Thréonine
Glx—Glycine—sérine
Glx étant l'acide glutamique ou la glutamine.

La différence essentielle entre les séquences peptidiques de la gliadine et de la gluténine concerne la glycine. En effet, ce résidu entre dans la composition de 8 peptides différents de la gluténine alors qu'il n'apparaît que dans une seule séquence provenant de la gliadine. Comme la teneur en glycine de la gluténine est supérieure à celle de la gliadine, et qu'en outre la liaison glutamine-glycine n'est pas attaquée par la pronase, on peut en déduire que la séquence glutamine-glycine est plus fréquente dans la gluténine. La même remarque peut être faite à propos de la proline dans la gliadine. A la suite de ces deux constatations, les auteurs pensent que l'une et l'autre de ces particularités contribuent aux différences de propriétés des gliadines et des gluténines.

Une étude récente d'Huebner, Wall et Donalson (1974 *a* et *b*) permet de nuancer ces hypothèses concernant la similitude de chaînes de gluténines et de gliadines. Ces auteurs ont obtenu des séparations satisfaisantes par combinaison des chromatographies d'exclusion stérique et d'échange d'ions. Ils distinguent ainsi, par filtration sur gel sur Sephadex G-200, 3 groupes de protéines A, B, C, qu'ils fractionnent ensuite par échange d'ions sur sulfoéthyl cellulose. Le détail du fractionnement est donné par la figure 11. L'examen des compositions en acides

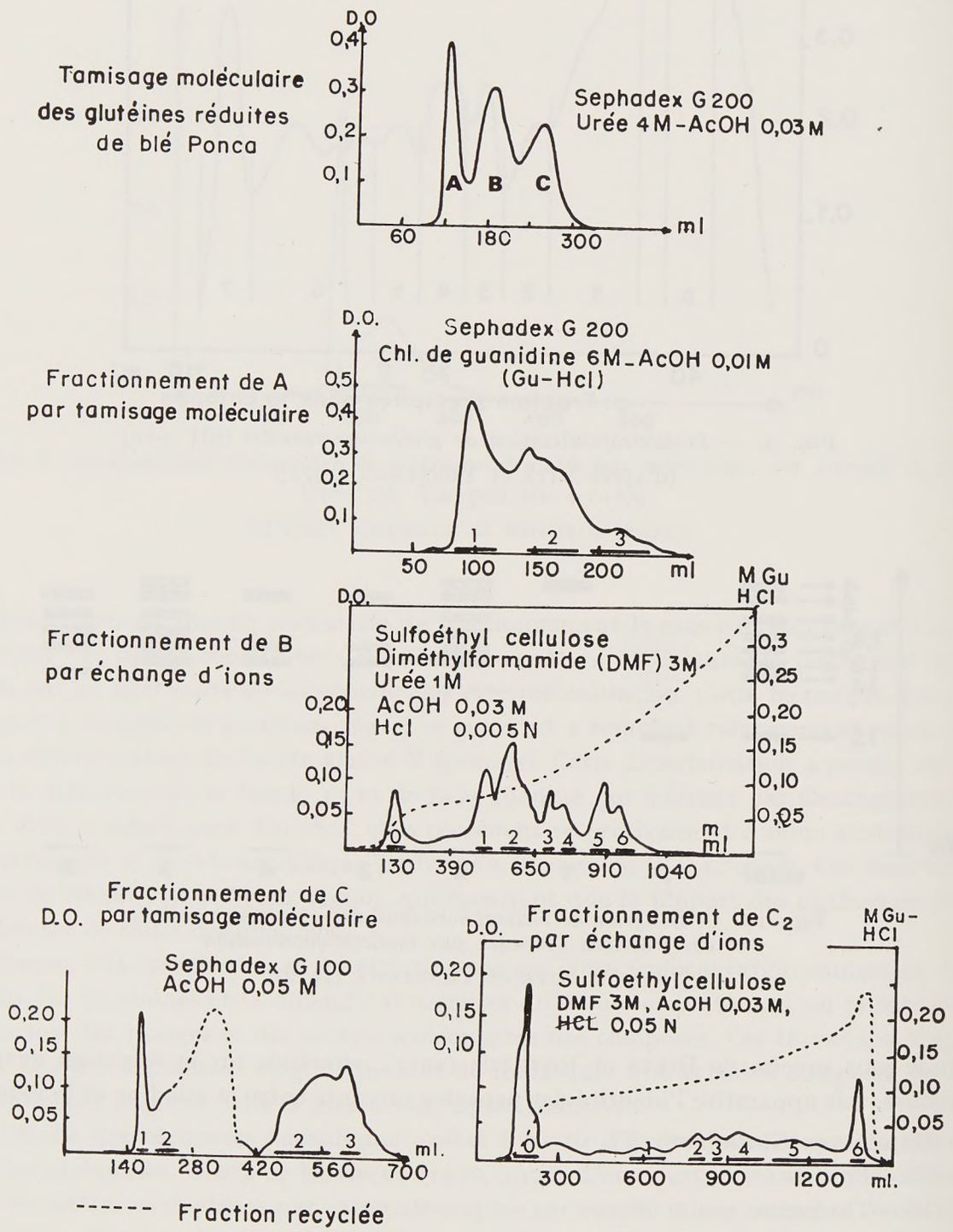


Fig. 11. — *Fractionnement des gluténines réduites de blé* Ponca (d'après Huebner et Wall (1974))

aminés (tabl. 7) des diverses fractions montre que, si les différences sont faibles à l'intérieur d'un même groupe, elles deviennent importantes d'un groupe à l'autre. En analysant ces compositions, Huebner, Donaldson et Wall (1974 *b*) ont remarqué des analogies entre le groupe A et les albumines, et entre le groupe C et les gliadines. Il semble que seul le groupe B soit particulièrement bien individualisé par sa composition en acides aminés. Il possède de fortes teneurs en glycine, proline, acide glutamique et pourrait occuper un rôle important dans la structure des gluténines. En effet, la glycine et la proline sont les constituants majeurs du collagène et de nombreuses protéines fibreuses.

TABLEAU 7

Composition en acides aminés de fractions de gluténine réduites et alkylées
(blé *Ponca*)
(d'après Huebner, Donaldson et Wall (1974 *b*))

	A_1		A_2		B_1		B_2		B_6		$C_{2,3}$		Gluténines totales	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Ac. aspartique	7,1	68	5,2	52	0,7	7	0,7	7	1,1	11	1,4	15	2,8	27
Thréonine	3,8	41	3,4	38	2,7	29	2,9	32	3,0	33	2,4	27	2,9	32
Sérine	5,8	70	6,6	83	5,1	62	6,0	72	6,2	74	7,0	89	6,0	74
Ac. glutamique	24,3	209	28,3	252	44,2	378	43,5	372	41,2	369	41,5	377	37,8	333
Proline	8,5	93	9,0	103	13,2	144	11,6	127	10,4	117	12,8	149	11,6	130
Glycine	6,3	106	3,5	62	11,6	194	11,5	192	8,3	142	2,0	36	4,8	84
Alanine	4,6	65	3,5	52	1,4	20	1,7	24	1,8	26	1,5	23	2,3	34
Valine	5,0	54	5,0	56	1,6	18	1,6	18	2,5	28	3,7	43	3,6	40
Cystéine	0,9	9	1,5	17	0,4	4	0,4	5	1,2	13	2,0	22	1,7	18
Méthionine	2,0	17	2,0	18	0,7	6	0,6	5	1,0	9	1,9	17	1,6	14
Isoleucine	3,7	36	3,8	38	0,6	6	0,7	7	2,0	20	3,5	36	3,0	30
Leucine	3,9	38	8,0	80	4,6	43	4,2	41	5,0	50	7,2	73	6,6	65
Tyrosine	5,6	39	4,0	29	7,9	54	8,3	58	6,1	44	2,0	14	4,2	30
Phénylalanine	4,7	36	5,6	45	0,5	4	0,6	5	2,1	16	5,6	46	4,6	36
Tryptophane	1,9	12	0,9	6	1,3	8	1,4	9	0,8	5	0,3	2	0,5	5
Lysine	3,8	33	2,6	24	0,8	8	1,0	9	1,1	10	0,8	7	0,6	15
Histidine	2,4	20	2,2	19	0,6	5	0,7	6	1,9	16	1,7	15	1,9	16
Arginine	5,2	38	4,1	31	1,6	12	2,1	15	2,8	21	2,5	19	3,2	24

(1) Résultats exprimés en g d'acides aminés pour 100 g d'acides aminés retrouvés.
(2) Résultats exprimés en nombre de résidus pour 1000 résidus retrouvés.

Si la fraction C ressemble globalement aux gliadines par sa composition en acides aminés, elle en diffère nettement par sa teneur importante en cystéine. Cette particularité conduit Huebner, Donaldson et Wall (1974) à penser que cette fraction possède, étant donné la fréquence de ses ponts disulfures, une structure de gluténines.

Ces conclusions sont en accord avec celles de Bietz et Wall (1973) qui ont isolé également des gluténines réduites et alkylées une fraction soluble dans l'éthanol, de type gliadine. En particulier ils comparent la composition en acides aminés de cette fraction avec celle de gliadines de hauts poids moléculaires séparées par tamisage moléculaire sur Sephadex G-100 et soulignent leur similitude (tabl. 8).

A la lumière de toutes ces études, il semble que l'on puisse distinguer trois familles de gluténines, les unes de type salinosolubles, les autres de type gliadines, les troisièmes ayant une spécifi-

cité propre. Il semble que cette répartition des gluténines ne soit pas absolue. En effet, CHARBONNIER (1973) montre que la proportion de gluténines alcoolosolubles varie suivant que l'extraction est précédée ou non d'une délipidation.

TABLEAU 8

Composition en acides aminés des fractions de S-aminoéthyl-gluténines solubles et insolubles dans l'éthanol à 70 p. 100

(d'après BIETZ et WALL (1973))

	AE-Gluténines insolubles		AE-Gluténines solubles		Gliadines de P. M. élevé		Gliadines		Gluténine*	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
Ac. aspartique	3,32	32	1,39	14	2,01	20	2,48	25	2,79	27
Thréonine	2,97	32	2,14	24	2,34	26	1,60	18	2,86	31
Sérine	5,41	66	5,67	72	5,56	70	4,00	51	4,81	59
Ac. glutamique	37,60	327	43,50	394	41,75	375	43,27	394	37,51	328
Proline	9,89	110	12,96	150	13,15	151	14,00	163	12,10	135
Glycine	7,56	129	1,85	33	2,78	49	1,40	25	5,36	92
Alanine	2,85	41	1,60	24	1,81	27	1,92	29	2,77	40
Valine	3,20	35	3,77	43	3,54	40	3,67	42	4,37	48
Cystéine	—	—	—	—	1,19	13	1,90	21	1,31	14
Méthionine	0,93	8	1,45	13	1,46	13	1,22	11	1,62	14
Isoleucine	2,35	23	3,64	37	3,37	34	3,81	39	3,36	33
Leucine	6,25	61	7,38	75	7,34	74	7,24	74	6,83	67
Tyrosine	5,94	42	2,04	15	2,33	17	2,70	20	3.80	27
Phénylalanine	3,22	25	5,20	45	5,12	41	5,42	44	4,10	32
Tryptophane	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Lysine	3,19	28[a]	2,96[a]	27[a]	1,10[a]	10	0,65	6	1,60	14
Histidine	1,57	13	1,51	13	1,64	14	2,20	19	1,80	15
Arginine	3,67	27	2,87	22	3,42	26	2,46	19	2,97	15

* La composition de la gluténine est donnée par BIETZ et WALL d'après une étude de WU et DIMLER (1963)

a : Inclut la teneur en AE-cystéine

(1) Résultats exprimé en g d'acides aminés pour 100 g d'acides aminés retrouvés.

(2) Résultats exprimés en nombre de résidus pour 1000 résidus retrouvés.

Cette classification n'est pas limitée au blé, mais semble également se dégager des études faites sur les glutélines des autres céréales (BIETZ, WALL, 1973). Quant au degré de similitude entre gliadines de haut poids moléculaire et gluténines de type gliadine, il reste encore mal défini. On peut penser que, si ces fractions sont voisines par leur composition en acides aminés, leurs caractères de solubilité et même leur masse moléculaire (BIETZ et WALL, 1973), elles peuvent différer par leur structure et leur rôle dans la constitution du gluten.

IV. — STRUCTURE DES GLUTÉNINES

Ces études physicochimiques, qui permettent de séparer les protéines en familles de constituants voisins et de déterminer leur composition en acides aminés et leur masse moléculaire moyenne, constituent le préalable nécessaire aux études de structure et de conformation des glu-

ténines. Elles sont complétées dans ce domaine par des travaux qui utilisent comme techniques d'investigation le dosage des ponts disulfures, la dispersion optique rotatoire dans différents milieux et la microscopie électronique.

Accessibilité des ponts disulfures. Liaisons inter- et intra-caténaires

Mettant à profit l'accessibilité variable des ponts disulfures aux réactifs suivant le milieu de réaction, les auteurs, à partir du dosage des liaisons S—S, cherchent à élaborer une hypothèse sur la répartition de ces liaisons dans la macromolécule. Ce dosage se ramène à celui des —SH obtenus par réduction des ponts disulfures. On dispose de plusieurs méthodes pour doser les groupements sulfhydriles ; les unes utilisent le dosage spectrophotométrique par la N-éthylmaléimide ou le 5-5' dithio-*bis* (acide 2-nitrobenzoïque) (réactif d'Ellman), les autres le dosage ampérométrique ou polarographique des ions métalliques susceptibles de se complexer avec les groupements sulfhydriles, les troisièmes enfin le dosage indirect du réducteur dans le milieu au cours de la réduction. Rappelons aussi pour mémoire la méthode de dosage mise au point par Smythe (1936) et reprise par Hotchkiss (1963) ; on mesure manométriquement le volume de CO_2 produit par l'acidification du milieu tampon bicarbonate-gaz carbonique par l'iodure issu de la réaction de l'iodoacétamide sur les groupements —SH ; cette méthode est rarement employée, car le dosage est très imprécis. Seuls les dosages par la N-éthylmaléimide (NEMI) ou les ions métalliques sont utilisés dans le cas des gluténines.

La méthode de dosage qui utilise la réaction d'addition des thiols sur la NEMI a été mise au point par Alexander (1957). On mesure la décroissance de la densité optique à 300 nm au fur et à mesure de la réaction d'addition ; cette réaction a lieu en tampon phosphate pH = 6,8 en présence d'un excès de réactif (Alexander, 1957 ; Marco, Graziani et Mosti, 1966). Elle est incompatible avec une réduction par les sulfites, les pH de ces deux réactions étant très différents. En outre, on peut craindre que l'encombrement stérique de la molécule de NEMI n'entrave la réaction si l'accessibilité des groupements sulfhydriles n'est pas parfaite.

Le dosage des ions métalliques a pour principe la réaction des métaux lourds sur les thiols :

$$R—S^- + M^+ \rightleftharpoons R—S—M.$$

La constante de dissociation du complexe formé est très faible et permet donc un dosage précis. Dans ces conditions, la fin de la réaction peut être déterminée par ampérométrie. En effet, lorsque tous les groupements sulfhydriles sont complexés, les ions métalliques libres provoquent une augmentation de l'intensité.

Les ions les plus utilisés sont les ions mercuriques. Ils présentent sur les ions Ag^{++} l'avantage d'être plus spécifiques des —SH. Leur inconvénient est que, suivant les conditions de réactions, ils peuvent donner plusieurs sortes de mercaptides $(RS)_2Hg$, RS_2Hg_2, $(RS)_2Hg_3$. Les dérivés organomercuriques n'ont pas ce défaut, tout en ayant une spécificité analogue à celle de l'ion mercurique (De Nuce De Lamothe, 1963).

Redman et Ewart (1971) utilisent le chlorure mercurique $HgCl_2$. Ils effectuent le dosage des ponts disulfures totaux en milieu chlorhydrate de guanidine 7M, et celui des S—S accessibles sans chlorhydrate de guanidine (tabl. 9).

McDermott, Stevens et Pace (1969) utilisent l'iodure méthylmercurique CH_3HgI en milieu urée 8M pour doser les S—S totaux. La valeur trouvée est 9,4 moles de ponts disulfures pour 10^5 grammes de gluténine ; Beckwith et Wall (1966) donnent 6,4. On remarque que la valeur de 8,4 fournie par Redman et Ewart (1971) est intermédiaire entre ces deux dernières valeurs.

Cecil et Wake (1962) pensent qu'il est raisonnable d'assimiler les ponts disulfures accessibles aux ponts intercaténaires. Dans le tableau de Redman et Ewart (tabl. 9), le nombre de liaisons S—S accessibles dosées représenterait donc la valeur maximale des ponts disulfures interchaînes.

Sur cette base, Redman et Ewart calculent qu'il y aurait 1,16 ponts disulfures intercaté-

naires par chaîne de polypeptides de gluténines et donnent une représentation linéaire de la structure de ces protéines (fig. 12).

Il est également intéressant de remarquer que, selon REDMAN et EWART, le réseau formé par les ponts disulfures serait plus dense dans le cas du maïs et de l'avoine. Nous verrons que cette hypothèse peut partiellement expliquer l'absence des propriétés visco-élastiques des protéines de ces céréales.

TABLEAU 9

Dosage des ponts disulfures des gluténines des céréales
(d'après REDMAN et EWART (1971))

	S-S accessibles en moles/10^5 g de protéines	S-S totaux en moles/10^5 g de protéines	Poids moléculaire par S—S accessible
Blé *Wichita*	5,00	8,6	20 000
Riz	5,54	8,9	18 100
Orge	6,16	8,5	16 200
Avoine	13,00	17,7	7 700
Maïs	7,08	9,8	14 100

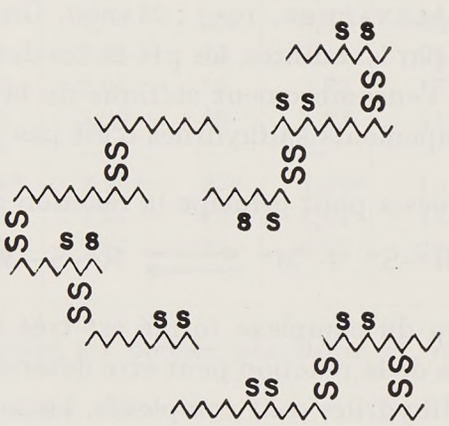


FIG. 12. — *Structure linéaire des gluténines d'après* REDMAN *et* EWART (1971)

Pour essentiels qu'ils soient, les ponts disulfures ne sont certainement pas les seules liaisons importantes dans la structure des gluténines. GODON (1969) pense, à la suite de DE DEKEN, que outre les résidus peu polaires, fort nombreux dans les protéines du gluten, certains groupements SH participeraient à des liaisons hydrophobes ; il est également probable que des liaisons hydrogène, des interactions dipole-dipole, contribuent à la structure de ces protéines. Des précisions à ce sujet ont été apportées par les études de viscosité, de sédimentation et de dispersion optique rotatoire dans différents solvants.

Taux d'hélicité

Les études de TAYLOR et CLUSKEY (1962) montrent que la viscosité des gluténines augmente quand la force ionique du solvant décroît, alors que les vitesses de sédimentation et de diffusion restent constantes. Si l'on dilue un milieu de force ionique donnée, les macromolécules ont tendance à se dérouler et à libérer certains ions ; or la probabilité que toutes les charges des protéines

soient neutralisées décroît quand la dilution croît. Ceci provoquerait le déroulement de la molécule par répulsion des chaînes portant des charges de même signe. Ce phénomène particulièrement prononcé chez les polyélectrolytes (Jirgensons, Straumanis, 1962), l'est d'autant plus dans le cas des gluténines que, selon Taylor et Cluskey (1962), ces protéines auraient en outre une structure secondaire plissée trop peu élaborée pour assurer à la molécule une conformation rigide en milieu acide.

Ceci est confirmé par les études de dispersion optique rotatoire de Cluskey et Wu (1965, 1966, 1971). Ces auteurs ont mesuré le taux d'hélicité des protéines dans différents solvants.

TABLEAU 10

Taux d'hélicité des gluténines dans différents solvants
(d'après Cluskey et Wu, (1971))

Solvants	A	B	Moyenne
Trifluoroéthanol	29	41	35
2-Chloroéthanol	32	37	34
Acide acétique 0,01N ; pH : 3,5	9	16	12
Tampon lactate ; pH : 3,2 ; μ : 0,05	10	20	15
Tampon lactate + Urée 3M	5	15	10
Urée 8M, pH : 6,3	1	9	5

A : Pourcentage d'hélice calculé par l'équation de Moffit ;
B : Pourcentage d'hélice calculé par l'équation de Drude à 2 termes.

La gluténine a un taux d'hélicité voisin de 15 p. 100 dans la solution d'acide acétique et dans le tampon lactate. On peut remarquer que l'urée 8M brise complètement cette structure et qu'au contraire le trifluoroéthanol et le 2-chloroéthanol la favorisent. Dans tous les cas, ce taux d'hélicité reste faible. Ceci peut être dû en partie à la teneur importante de ces protéines en proline, qui par son noyau pyrrolidine casse la structure hélicoïdale. Wu et Cluskey (1971) en concluent que la proline n'est pas uniformément répartie dans la gluténine, et que seules les séquences qui en sont dépourvues ont une structure hélicoïdale. La conformation des gluténines en milieu aqueux est alors le résultat d'une succession de séquences de structure plissée mal définie et de séquences hélicoïdales.

Observation de la structure au microscope électronique. Hypothèse sur l'origine cytologique

Les observations de microscopie électronique à transmission faites par Simmonds (1972), Crozet *et al.* (1974), s'accordent pour attribuer aux gluténines une structure hétérogène, essentiellement granulaire et fibrillaire. Les travaux récents de Orth, Dronzek et Bushuk (1973) effectués en balayage soulignent également cette hétérogénéité ; la gluténine apparaît en effet constituée de filaments et de disques reliés entre eux. Ils montrent aussi que, suivant les variétés, les structures sont sensiblement différentes par la proportion entre disques et filaments. Ces protéines se distinguent particulièrement bien des gliadines de structure parfaitement « lisse ».

Selon Hess et Mahl (1954) et Seckinger et Wolf (1970), le diamètre des fibrilles serait compris entre 100 et 200 Å. Pour Grosskreutz (1961), la taille des particules protéiques du glu-

ten, observées en suspension, varierait de 100 à 300 Å. Mais il est difficile de comparer ces résultats obtenus à partir de techniques d'observation très différentes. Plusieurs études ont été également consacrées à la structure native de ces protéines au sein de l'albumen et de la farine et à leur processus de formation aux différents stades de l'évolution du grain.

Buttrose (1962) situe les premiers dépôts protéiques au huitième jour après la fécondation, Morton, Palk et Raison (1964) au dixième jour. Il semble admis que la plupart de ces formations protéiques sont entourées de membranes et forment des corpuscules, variables en taille et en forme (protein bodies). Morton, Palk et Raison pensent qu'il s'agit de véritables « protéoplastes » par référence aux travaux de Wellings et Deome (1961) concernant les tissus animaux. Ces auteurs attribuent leur formation à la condensation dans les vésicules de Golgi de protéines synthétisées dans le réticulum endoplasmique. Mais Buttrose conteste cette hypothèse suivant laquelle les corpuscules protéiques seraient d'origine golgienne, car il existe certains dépôts apparemment libres au sein du cytoplasme. De toutes façons, quelle que soit leur nature, corpusculaire ou non, les dépôts protéiques semblent au microscope électronique parfaitement homogènes et identiques entre eux. Il est donc impossible au sein de la cellule de différencier gluténines et gliadines.

Pourtant les études de Feillet (1965) et de Bushuk et Wrigley (1971) prouvent que, lors de la formation du caryopse, l'albumen du grain de blé contient ces deux familles de protéines.

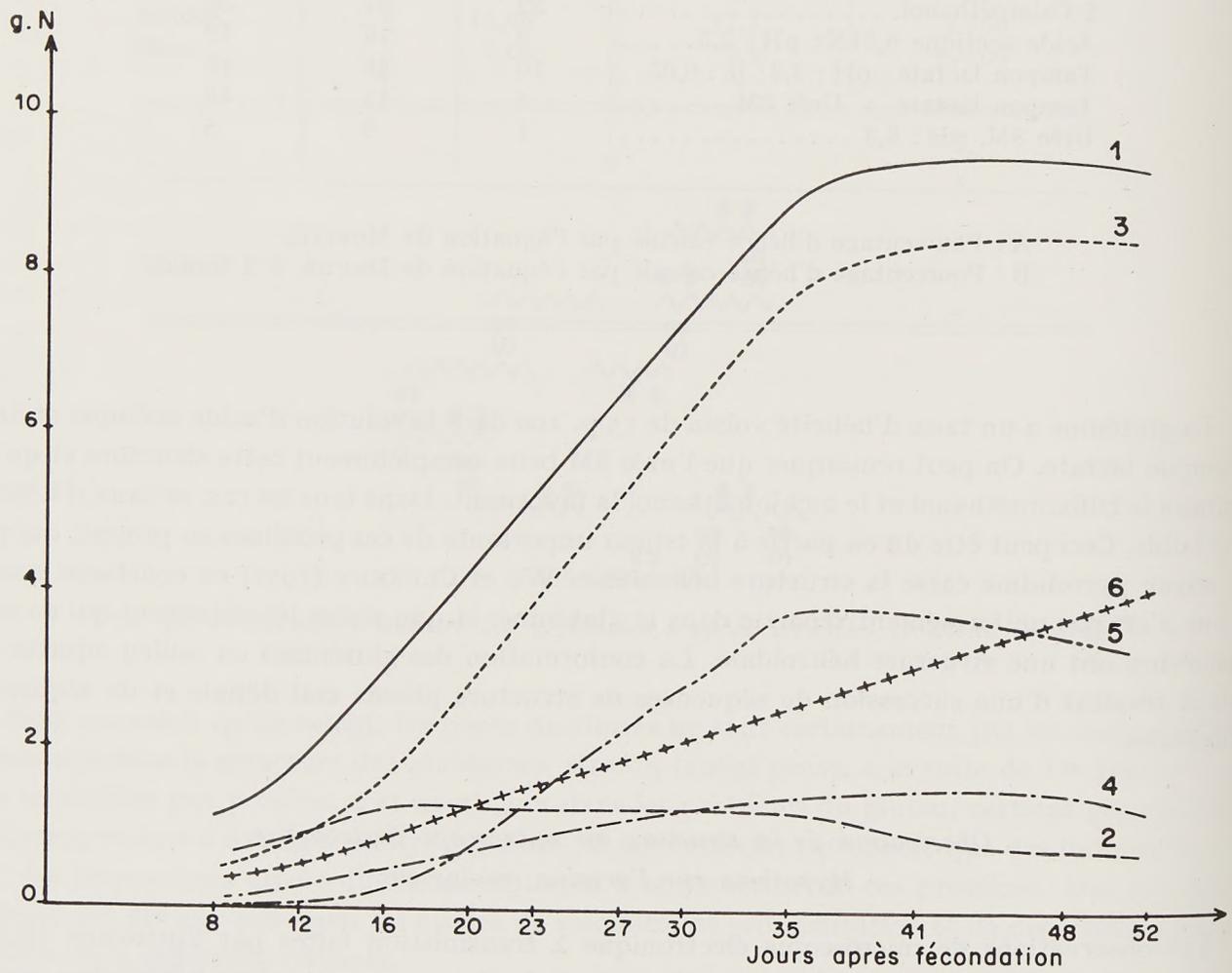


Fig. 13. — *Évolution de la composition azotée du grain* INRA 62-15 *au cours de sa maturation*
(g. N pour 100 grains)
(d'après Feillet (1965))

1 ———— N total
2 — — — — — N non protéique
3 - - - - - - - - - - - N protéique
4 —·—·—·— N protéines solubles
5 —··—··— N gliadines
6 + + + + + N gluténines

Les granules protéiques contiennent donc dès leur formation des molécules de poids moléculaire différent ; aussi la formation des gluténines n'est pas seulement le résultat de la polymérisation de petites molécules au cours de la maturation. Il faut remarquer qu'il y a cependant des divergences entre ces dernières études. Selon FEILLET (1965), la teneur en gliadine de la variété *INRA 62-15* est très faible les premiers jours, croît très vite jusqu'au trente-cinquième, puis régresse jusqu'à la maturation. La gluténine suit une évolution inverse, tandis que le pourcentage des protéines solubles, important dès la fécondation, décroît rapidement pour se stabiliser très vite (fig. 13 et 14). BUSHUK et WRIGLEY (1971) trouvent, au contraire, que le taux des gluténines croît tout au long de la maturation, que celui des gliadines reste pratiquement constant alors que la teneur en albumines et globulines ne cesse de décroître (fig. 15).

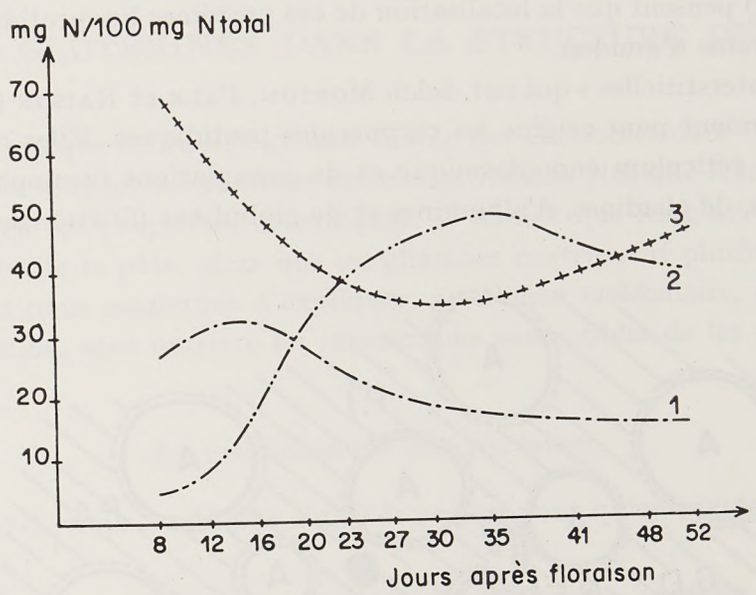


FIG. 14. — *Importance relative des classes protéiques du grain* INRA 62-15 *en cours de maturation* (d'après FEILLET (1965))

1 ——·——·—— protéines solubles
2 ——··——··—— gliadines
3 + + + + + gluténines

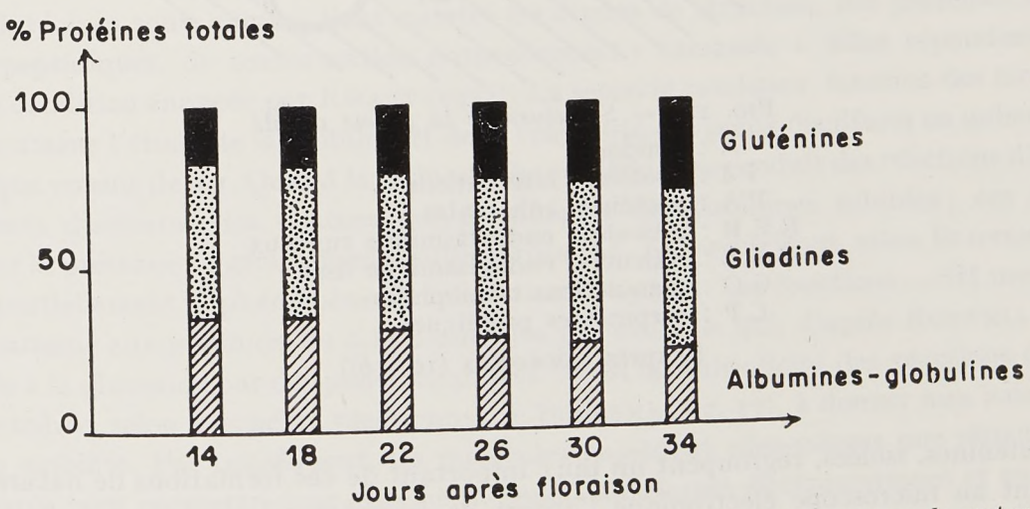


FIG. 15. — *Importance relative des classes protéiques du grain* Talbot *en cours de maturation* (d'après BUSHUK et WRIGLEY (1971))

Il est de toute façon difficile de comparer ces travaux lorsqu'on sait quelle peut être l'influence des conditions climatiques sur l'évolution d'une plante en cours de maturation. Il peut alors n'y avoir aucune correspondance physiologique entre les dates de ces deux graphiques.

Il est également possible que ces divergences proviennent des différences de variétés des grains étudiés. En effet, Bushuk et Wrigley (1971) remarquent que la variation du rapport gliadine/gluténine au cours de la maturation est inversée suivant qu'on le calcule sur la variété *Manitou* ou *Talbot*. L'évolution au cours du mûrissement n'affecte pas seulement le taux des différentes familles protéiques dans l'albumen ; la structure est également changée. Au cours de la maturation, des corpuscules protéiques (protein bodies) grossissent, leurs membranes sont rompues et emprisonnées au sein des protéines.

Hess (1960) a étudié l'albumen à maturité. Il distingue 2 classes de protéines : les unes « interstitielles » (Zwickel) sont entre les grains d'amidon, les autres dites « adhérentes » (Haft) les entourent. Cette dernière fraction serait de nature lipoprotéique. Pour Buttrose (1962), il s'agit d'une combinaison des membranes cytoplasmiques avec celles d'organites cellulaires. Simmonds (1972 *a*) et Crozet *et al.* (1974) pensent que la localisation de ces protéines lipoprotidiques ne se limite pas à la périphérie des grains d'amidon.

Les protéines « interstitielles » qui ont, selon Morton, Palk et Raison (1964), le rôle de protéines de réserve, auraient pour origine les corpuscules protidiques. Elles contiennent des fragments importants de réticulum endoplasmique et de granulations osmiophiles et sont formées à la fois de gluténines, de gliadines, d'albumines et de globulines (Simmonds, 1972 *b*) (fig. 16).

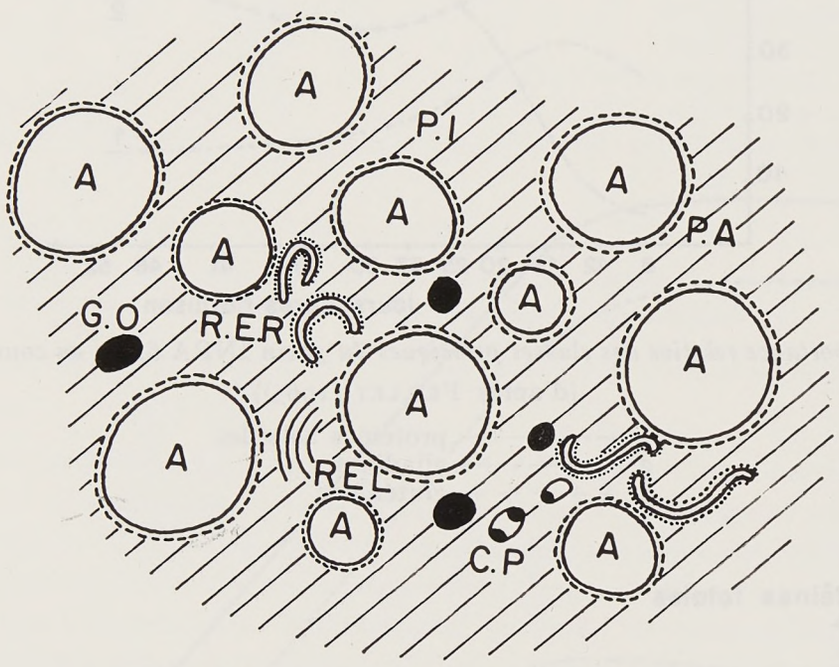


Fig. 16. — *Structure de la farine de blé*
A : amidon
P.I : protéines interstitielles
P.A : protéines adhérentes
R.E.R : réticulum endoplasmique rugueux
R.E.L : réticulum endoplasmique lisse
G.O : granulations osmiophiles
C.P : corpuscules protéiques
(d'après Simmonds (1972 *b*))

Les gluténines, isolées, regroupent un taux important de ces formations de nature lipidique, qui prennent au microscope électronique l'aspect de granulations osmiophiles. Simmonds distingue deux types de granules osmiophiles ; certains ont une forme et une taille très variables, les autres sont de section circulaire, de diamètre compris entre 1 μ et 3 μ. Les premières sont assimilées aux lipoprotéines alors que les secondes correspondent très certainement à des gouttelettes de lipides libres. En effet, une extraction par l'éther de pétrole fait disparaître ces inclusions. Ces résultats sont confirmés par les études de Crozet *et al.* (1974). Cependant ces auteurs, dans une étude de la farine de blé, attribuent la présence de gouttelettes lipidiques à des artefacts dus à la

fixation de la préparation par l'acide osmique et considèrent qu'à l'état natif la répartition des lipides est certainement différente (Crozet, Guilbot, 1974). L'origine des lipoprotéines est attribuée aux résidus d'organites cellulaires et de réticulum endoplasmique alors que les lipides libres pourraient provenir de la mouture du germe et de l'aleurone (Seckinger, Wolf, 1970).

Ceci laisse entrevoir la complexité des liaisons qui peuvent exister au sein du gluten. Il est d'autant plus difficile de les expliquer et de les prévoir que l'on étudie en général les protéines extraites, donc libérées de ces interactions. Aussi, il est nécessaire, pour conclure cette étude, de préciser le rôle des gluténines dans la formation, la structure et les propriétés rhéologiques du gluten.

V. — LES GLUTÉNINES DANS LA STRUCTURE DES PÂTES

Il est peut être utopique de vouloir définir le rôle des gluténines dans les propriétés rhéologiques des pâtes, car ce sont les interactions entre constituants plus que leurs caractères propres qui confèrent au gluten ses propriétés mécaniques. Il semble que les gluténines influent sur la résistance à l'étirement de la pâte, alors que les gliadines contribuent plutôt à l'extensibilité du gluten. C'est pourquoi nous essaierons d'expliquer, au niveau moléculaire, ces propriétés viscoélastiques de la gluténine, sans omettre les interactions susceptibles de les modifier.

La visco-élasticité des gluténines

Pour Ewart (1972), trois conditions sont nécessaires pour qu'un matériau possède des propriétés viscoélastiques :

— les molécules doivent avoir une conformation « ramassée » dans les conditions normales, mais être capables de s'allonger considérablement ;
— l'étirement de la molécule ne doit pas être entravé par des forces inter- ou intra-moléculaires trop grandes ;
— la présence de liaisons intermoléculaires est nécessaire pour assurer la continuité de la structure.

Or les gluténines sont, comme l'ont montré les études de structure, des protéines à longues chaînes polypeptidiques, de conformation naturellement « ramassée ». Elles répondent en cela à la première condition énoncée par Ewart (1972). La seconde condition, fonction des forces intermoléculaires, amène l'étude de la mobilité et de la réactivité des ponts disulfures en milieu humide de force ionique voisine de 0,1. Quand la farine est humidifiée, il se produit des réactions d'échanges entre les ponts disulfures des chaînes polypeptidiques de gluténines solubles ; ces réactions catalysées par la présence de groupements sulfhydriles (fig. 17) permettent, selon Bloksma (1972), d'expliquer partiellement le phénomène de relaxation des pâtes. Les fonctions —SH mises en jeu peuvent appartenir aux gliadines ou à la β-amylase par exemple qui, d'après Roswell et Goad (1962) est liée à la gluténine par des ponts disulfures. Aussi la multiplicité des réactions d'échange possibles contribue, selon le schéma réactionnel de Bloksma (fig. 17), à donner aux liaisons S—S une certaine mobilité. Par conséquent, les molécules possèdent elles-mêmes une structure suffisamment souple pour permettre leur étirement. Quant aux forces électrostatiques et aux liaisons hydrogène, elles sont pratiquement supprimées par la force ionique de l'eau d'hydratation (Bloksma, 1972). La continuité de la pâte, troisième condition énoncée par Ewart (1972), est assurée d'après lui par les ponts disulfures.

Ainsi les trois conditions postulées par Ewart sont vérifiées par les gluténines. Cet auteur complète son explication sur l'élasticité des gluténines en supposant que les ponts disulfures intercaténaires ont tendance à ramener les molécules étirées à leur conformation initiale « ramassée »

(Ewart, 1968). Il semble en effet que cette deuxième configuration soit plus stable, car elle a une énergie libre plus faible. Toutes ces propriétés des gluténines convergent pour expliquer, de façon assez satisfaisante, leur viscoélasticité. L'exemple opposé est fourni par le maïs et l'avoine. Les gluténines de ces céréales possèdent des chaînes polypeptidiques très courtes et un réseau de ponts disulfures assez dense pour que les réactions d'échanges décrites par Bloksma (1972) deviennent impossibles. En outre, plusieurs vérifications ont été faites du rôle important des ponts disulfures et des groupements sulfhydriles dans les propriétés rhéologiques des pâtes. Bloksma (1972), Sullivan (1963) et Tsen (1967) s'accordent pour remarquer que l'oxydation ménagée des —SH par l'iodate et le bromate augmente la résistance à l'étirement et diminue l'extensibilité de la pâte.

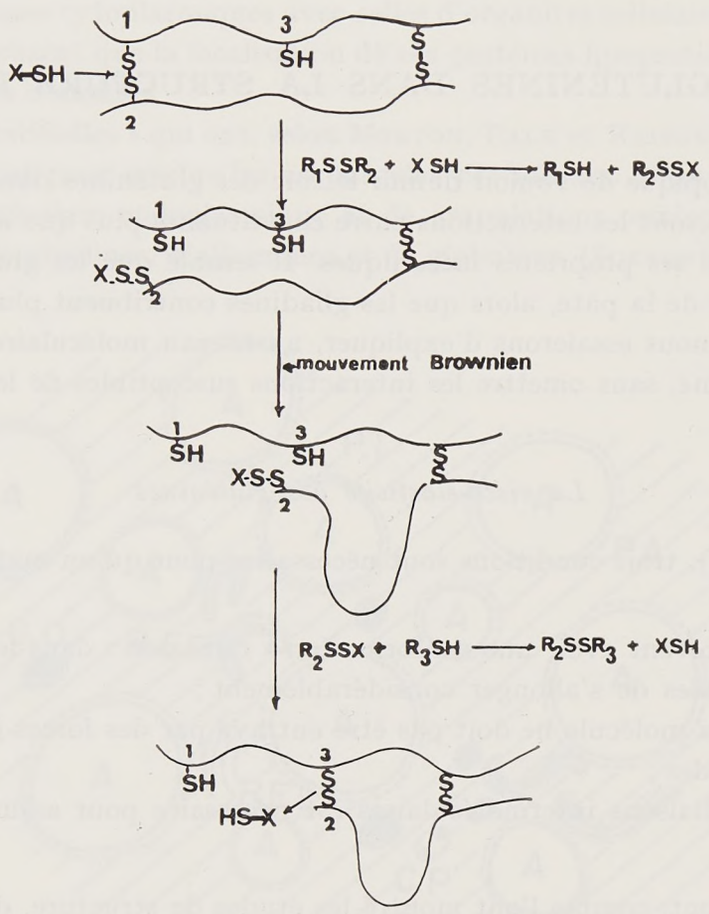


Fig. 17. — *Schéma de réactions d'échanges entre groupements thiols et disulfures* (d'après Bloksma (1972))

En présence d'un excès de ces réactifs, la pâte devient faible et perd une grande partie de ses qualités boulangères. En effet, alors qu'au cours d'un pétrissage normal il se produit une simple désagrégation des protéines de hauts poids moléculaires, l'addition en excès d'oxydants ou d'agents bloquants provoque vraisemblablement la dépolymérisation de ces protéines (Tanaka, Bushuk, 1973 *a*, *b*, *c*). Pour expliquer ce phénomène déjà observé par de nombreux auteurs (Sullivan, Damle et Schipke, 1963 ; Tsen, Hlynka, 1967), Tanaka et Bushuk proposent le mécanisme de réaction avancé par Spackman, Stein et Moore (1960) lors d'une étude sur la ribonucléase

$$G—SS—G + OH^- \rightleftharpoons GS^- + GSOH \qquad (1)$$

$$GS^- + NEMI \longrightarrow GS—NEMI. \qquad (2)$$

Malgré sa faible constante d'équilibre, l'équilibre (1) est déplacé en présence d'un excès de NEMI vers la formation de mercaptide. Par conséquent les ponts disulfures sont rompus en grand nombre. Ceci entraîne une dégradation des propriétés structurales du gluten et amoindrit la force de la pâte.

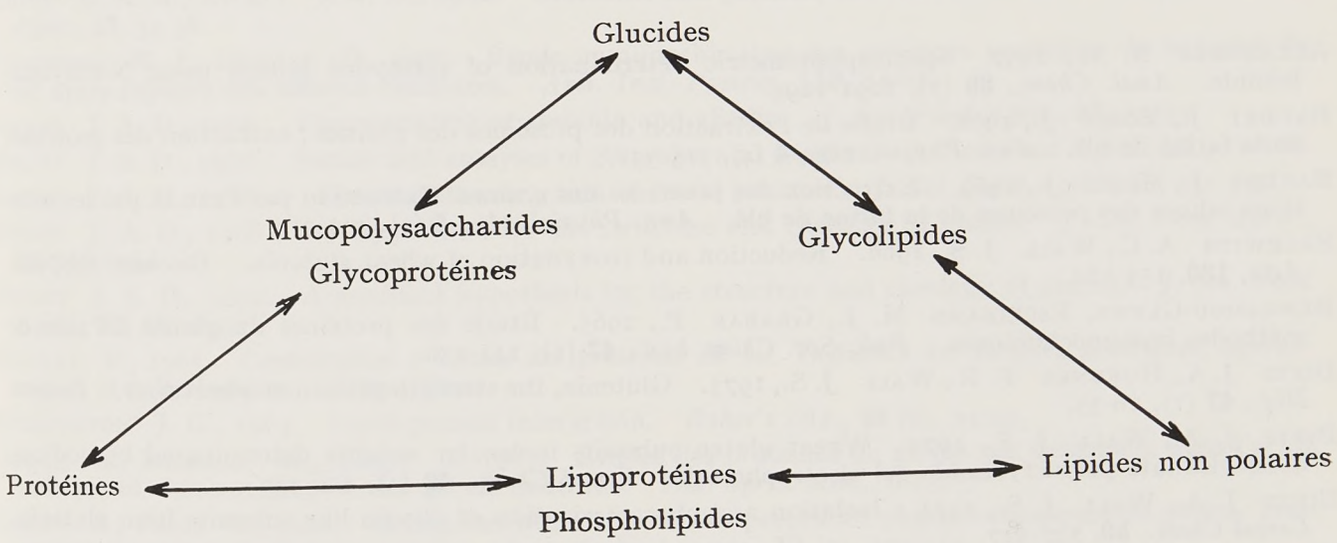
Cependant, les études récentes permettent de nuancer ces propos. Il semble en effet que des composés de nature lipidique, ou glucidique, associés aux protéines contribuent à donner aux pâtes de farine de blé leurs propriétés.

Influence des lipides, des glucides et des autres facteurs chimiques

Nous avons déjà signalé précédemment l'importance des glycolipides dans la formation du gluten. D'après Hoseney, Finney et Pomeranz (1970), il semble que les glycolipides soient reliés par leur pôle hydrophile aux gliadines et leur pôle hydrophobe aux gluténines.

Par ailleurs, Daftary *et al.* (1968) ont montré que l'addition à la pâte de lipides polaires, et particulièrement de glycolipides, augmente son volume. Il est probable que les lipides se combinent aux protéines et modifient les interactions moléculaires. Après un certain temps de pétrissage, on a affaire à un réseau lipido-protéique dans les mailles duquel sont insérés les grains d'amidon.

On s'est rendu compte également que les glucides, et en particulier les pentosanes, composés provenant des parois cellulaires de l'albumen, influaient sur la structure du gluten par leur caractère très hydrophile. Kundig, Neukom et Deuel (1961) ont fractionné les pentosanes d'extraits aqueux de farine par chromatographie d'échange d'ions. Ils ont obtenu un seul composé glucidique pur et plusieurs autres constituants liés à des protéines. Or, les travaux récents de D'Appolonia, Gilles et Medcalf (1970) ont montré que seuls les pentosanes liés aux protéines augmentaient le volume des pâtes. Pour résumer toutes ces interactions qui contribuent à la formation de la pâte, Wall (1971) propose le schéma récapitulatif suivant :



Il faudrait compléter ce schéma en reliant tous ces composés par l'eau dont Petit et Guilbot (1966) soulignent l'importance. Nous avons déjà noté son rôle dans les réactions d'échange des ponts disulfures. Son rôle est alors celui d'un agent vecteur des réactifs. Nous avons également remarqué que l'eau est capable d'affaiblir ou de rompre certaines liaisons. Petit et Guilbot lui attribuent un autre rôle dans la formation de la pâte ; lorsqu'elle se trouve excéder le seuil nécessaire à la réalisation des structures, l'eau dissout sels, protéines, glucides et fait gonfler les grains d'amidon lésés et les pentosanes insolubles. Or, le gonflement, en augmentant la mobilité des groupements réactifs, favorise la formation de la pâte. De plus, il permet la diffusion de l'oxygène qui peut ainsi oxyder les —SH et les complexes glycoprotéiques. Ceci donne naissance à un gel réticulé qui contribue sinon à la ténacité du moins à la viscosité de la pâte.

Cette étude souligne la multiplicité et la complexité des interactions entre les composants d'une pâte boulangère. Il est difficile alors de définir précisément le rôle des gluténines. On sait bien sûr que ces macromolécules sont responsables de la résistance du gluten à l'étirement, que les groupements sulfhydriles et les ponts disulfures sont en partie à l'origine de ces propriétés viscoélastiques, mais les interactions avec les lipides libres, les lipoprotéines, les glycolipides, les pentosanes restent pratiquement inconnues.

CONCLUSION

On peut, au travers de cette mise au point bibliographique, se rendre compte des progrès réalisés depuis une vingtaine d'années dans l'étude des gluténines. Ces progrès sont surtout relatifs à la meilleure connaissance des différents constituants et de la conformation de ces macromolécules.

Il faut remarquer que l'intérêt de l'étude des composés glucidiques et lipidiques et de leurs interactions avec les protéines du gluten a longtemps semblé minime devant l'étendue des problèmes posés par ces protéines. Il y a seulement une dizaine d'années que les chercheurs, conscients du rôle technologique des constituants non protéiques du gluten, ont entrepris leur étude. On peut penser qu'elle permettra d'expliquer un certain nombre des propriétés rhéologiques du gluten et d'apporter une meilleure maîtrise des processus technologiques dans les industries de cuisson de la farine de blé.

Reçu pour publication en juillet 1974.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Alexander N. M., 1957. Spectrophotometric determination of sulfhydril groups using N-ethylmaleimide. *Anal. Chem.*, **30** (7), 1291-1294.

Baudet J., Mossé J., 1962. Étude de l'extraction des protéines des graines ; extraction des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. vég.*, **4** (4), 315-331.

Baudet J., Mossé J., 1963. Extraction des protéines des graines. Extraction par l'eau et par les solutions salines des protéines de la farine de blé. *Ann. Physiol. vég.*, **5** (4), 303-319.

Beckwith A. C., Wall J. S., 1966. Reduction and reoxydation of wheat glutenin. *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 155-162.

Benhamou-Glynn, Escribano M. J., Grabar P., 1965. Étude des protéines du gluten à l'aide de méthodes immunochimiques. *Bull. Soc. Chim. biol.*, **47** (1), 141-156.

Bietz J. A., Huebner F. R., Wall J. S., 1973. Glutenin, the strength protein of wheat flour. *Baker's Dig.*, **47** (1), 26-35.

Bietz J. A., Wall J. S., 1972. Wheat gluten subunits molecular weights determinated by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chem.*, **49** (4), 416-430.

Bietz J. A., Wall J. S., 1973. Isolation and characterization of gliadin-like subunits from glutenin. *Cereal Chem.*, **50**, 537-547.

Bietz J. A., Rothfus J. A., 1970. Comparison of peptides from wheat gliadins and glutenins. *Cereal Chem.*, **47**, 381-392.

Bietz J. A., Rothfus J. A., 1971. Differences in amino acid sequences of gliadin and glutenin. *Cereal Chem.*, **48**, 677-690.

Blish M. J., Sanstedt R., 1929. The nature and identity of wheat glutenin. *J. Biol. Chem.*, **85**, 195-205.

Bloksma A. H., 1972. Flour composition, dough rheology, baking quality. *Cereal Sci. Today*, **17** (12), 380-386.

Bourdet A., 1956. Les protides des céréales. *Ann. Technol. agric.*, 181-318.

Bushuk W., Wrigley C. W., 1971. Glutenin in developping wheat grain. *Cereal Chem.*, **48**, 448-455.

Buttrose M. S., 1962. Ultrastructure of the developping wheat endosperm. *Aust. J. Biol. Sci.*, **16** (2), 305-317.

Cecil R., McPhee J. R., 1955. A kinetic study of the reactions on some disulphides with sodium sulfite. *Biochem.*, **60**, 496-506.

Cecil R., Wake R. G., 1962. The reactions of inter and intra chain disulphide bonds in protein with sulphite. *Biochem. J.*, **82** (3), 401-406.

Charbonnier L., 1973. Étude des protéines alcoolo-solubles de la farine de blé. *Biochimie*, **55**, 1217-1225.

Cleland W. W., 1964. Dithioerythritol, a new protective reagent for SH groups. *Biochem.*, **3** (4), 480-482.

Clements R. L., 1973. Effect of prior salt treatment on gluten dispersibility. *Cereal Chem.*, **50**, 87-100.

Cluskey J. E., Wu Y. V., 1966. Optical rotary dispersion of wheat gluten, gliadin and glutenin in acetic acid and aluminium lactate systems. *Cereal Chem.*, **43** (1), 119-126.

Cluskey J. E., Wu Y. V., 1971. Optical rotary dispersion, circular dichroïsm and infrared studies of wheat gluten proteins in various solvents. *Cereal Chem.*, **48** (3), 203-211.

Crestfield A. M., Moore S., Stein W. H., 1963. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins. *J. Biol. Chem.*, **238** (2), 622-627.

Crow M. J. A., Rothfus J. A., 1968. Chromatography of proteins from gluten. *Cereal Chem.*, **45** (5), 413-420.

Crozet N., Godon B., Petit L., Guilbot A., 1974. Submicroscopic structure of wheat flour and gluten lipoprotein components. *Cereal Chem.*, **51**, 288-299.

Crozet N., Guilbot A., 1974. A note on the influence of osmium fixation on wheat flour lipids observation by transmission and scanning electron microscopy. *Cereal Chem.*, **51**, 300-304.

Daftary R. D., Pomeranz Y., Shogren M., Finney K. F., 1968. Functionnal breadmaking properties of wheat flour lipids. The role of flour lipids fractions in breadmaking. *Food Technol.*, **22** (3), 327-330.

D'Appolonia B. L., Gilles K. A., Medcalf D. G., 1970. Effect of water soluble pentosans on gluten starch loaves. *Cereal Chem.*, **47**, 194-204.

D'Appolonia B. L., Gilles K. A., 1971. Pentosans associated with gluten. *Cereal Chem.*, **48**, 427-436.

De Deken R. H., Mortier A., 1955. Étude du gluten de froment, solubilisation. *Biochem. Biophys. Acta.*, **16**, 354-360.

De Nuce de Lamothe, 1963. Mise au point bibliographique sur les groupes sulfhydriles et disulfures de la farine de blé (Rapport interne).

De Marco C., Graziani M. T., Mosti R., 1966. Spectrophotometric determination of thiols and disulfides with N-ethylmaleinimide. *Anal. Biochem.*, **15**, 40-44.

Elton G. A. M., Ewart J. A. D., 1966. Glutenins and gliadins, electrophoretic studies. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 34-38.

Escribano M. J., Grabar P., 1966. Étude immunochimique des protéines insolubles de la farine de blé après rupture des liaisons disulfures. *Ann. Inst. Pasteur*, **110**, 84-88.

Ewart J. A. D., 1966. Fingerprinting of glutenin and gliadin. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 30-33.

Ewart J. A. D., 1967. Amino acid analyses of glutenins and gliadins. *J. Sci. Food Agric.*, **18**, 111-116.

Ewart J. A. D., 1968 *a*. Fractionnal extraction of cereal proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **19**, 241-245.

Ewart J. A. D., 1968 *b*. A hypothesis for the structure and rheology of gluten. *J. Sci. Food Agric.*, **19**, 617-623.

Ewart J. A. D., 1972. A modified hypothesis for the structure and rheology of gluten. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 687-699.

Feillet P., 1965. *Contribution à l'étude des protéines du blé. Influence des facteurs génétiques, agronomiques et technologiques.* Thèse, Paris.

Fullington J. G., 1963. Lipid-protein interaction. *Baker's Dig.*, **43** (6), 34-39.

Godon B., Richard H., Petit L., 1967. Études des protéines du gluten par dispersion dans l'acide acétique et chromatographie sur gel de dextrane. *Ind. agric. alim.*, 9-15.

Godon B., Petit L., 1968. Action des ultra-sons sur les propriétés physico-chimiques du gluten. Traitement du gluten de farine normale. *Ann. Technol. agric.*, **17** (2), 103-114.

Godon B., 1969. *Étude physico-chimique des associations protéiques du gluten de blé.* Thèse, Paris, C. N. R. S., A. O., 3274.

Grosskreutz J., 1961. The molecular size and shape of some major wheat protein fractions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **51**, 277-282.

Gundlach G. H., Moore S., Stein W. H., 1959. The reaction of iodoacetate with methionine. *J. Biol. Chem.*, **234** (7), 1761-1764.

Hess K., Mahl, 1954. Elektronenmikroskopische Beobachtungen an Mehl und Mehl präparaten von Weizen. *Mikroskopie*, **9**, 81-88.

Hess K., 1960. Weizenprotein und Weizenlipoproteid. *Qual. Plant. Mat. veg.*, **6**, 312-326.

Hoseney R. C., Finney K. F., Pomeranz Y., 1970 *a*. Functionnal (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. Gliadin-lipid-glutenin interaction in wheat gluten. *Cereal Chem.*, **47**, 135-146.

Hoseney R. C., Pomeranz Y., Finney K. F., 1970 *b*. Functionnal (breadmaking) and biochemical properties of wheat flour components. Petroleum ether soluble lipoproteins of wheat flour. *Cereal Chem.*, **47**, 153-160.

Hotchkiss D. R., 1963. A manometric determination of sulfhydril groups and its application to proteins in native and denatured states. *Bioch. Zeitschrift*, **338**, 848-853.

Huebner F. R., Rothfus J. A., Wall J. S., 1967. Isolation and chemical comparison of different gamma-gliadins from hard red winter wheat flour. *Cereal Chem.*, **44**, 221-229.

Huebner F. R., Rothfus J. A., 1971. Evidence for glutenin in wheat : stability toward dissociating forces. *Cereal Chem.*, **48** (5), 469-479.

HUEBNER F. R., WALL J. S., 1974 *a*. Wheat glutenin subunits. I. Preparative separation by gel filtration and ion-exchange chromatography. *Cereal Chem.*, **51**, 228-240.

HUEBNER F. R., DONALDSON G. L., WALL J. S., 1974 *b*. Wheat glutenin subunits. II. Compositional differences. *Cereal Chem.*, **51**, 240-249.

JANKIEWIECZ M., POMERANZ Y., 1965. Isolation and characterization of wheat flour proteins. *J. Sci. Food Agric.*, **16**, 652-658.

JIRGENSONS B., STRAUMANIS M. E., 1962. *A short text book of colloid chemistry*. Pergamon Press Ltd.

JONES R. W., TAYLOR N. W., SENTI F. R., 1959. Electrophoresis and fractionnation of wheat gluten. *Arch. Biochem. Biophys.*, **84**, 363-376.

JONES R. V., BABCOCK G. E., TAYLOR N. W., DIMLER R. J., 1963. Fractionation of wheat gluten by gel filtration. *Cereal Chem.*, **40** (4), 409-414.

KUNDIG. W., NEUKOM H., DEUEL H., 1961. Chromatographische Fractionierung von wasserlöslichen Weizenmehlpentosanen an DEAE Cellulose. *Helv. chim. Acta*, **44**, 823-828.

LEFEBVRE J. Résultats non publiés, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., Massy.

MCDERMOTT, STEVENS D. J., PACE J., 1969. Modification of flours proteins by disulphide interchange reactions. *J. Sci. Food Agric.*, **20**, 213-217.

MAES E., 1962. Progressive extraction of proteins. *Nature*, **193**, 880.

MEREDITH O. B., WREN J. I., 1966. Determination of molecular weight distribution in wheat flour proteins by extraction and gel fltiration in a dissociating medium. *Cereal Chem.*, **43** (2), 169-186.

MITA T., YONEZAWA D., 1971. Separation of component polypeptides of glutenin by isoelectric focusing. *Agric. Biol. Chem.*, **35** (11), 1792-1798.

MORTON R. K., PALK B. A., RAISON J. K., 1964. Intracellular components associated with protein synthesis in developping wheat endosperm. *Biochem. J.*, **91**, 522-528.

MOSSÉ J., BAUDET J., 1964. Extraction des protéines des graines. Extraction exhaustive et fractionnement des protéines de la farine de blé. Composition en acides aminés des 17 fractions séparées. *Ann. Physiol. vég.*, **6** (4), 285-304.

ORTH R. A., BUSHUK W., 1973. Studies on glutenin. Comparison of preparative methods. *Cereal Chem.*, **50**, 106-113.

ORTH R. A., DRONZEK B. L., BUSHUK W., 1973. Studies of glutenin. IV. Microscopic structure and its relations to breadmaking quality. *Cereal. Chem.*, **50**, 688-696.

PETIT L., GUILBOT A., 1966. Hypothèses sur les mécanismes physico-chimiques de la formation de la pâte. Le pétrissage. *Revue du C. T. U., 1er cycle*, 39-48.

PLUMMER T. H. J. R., HIRS C. H. W., 1964. On the structure of bovine pancreatic ribonuclease B. *J. Biol. Chem.*, **239** (8), 2530-2538.

PONTE J. G. Jr., DE STEFANIS V. A., COTTON R. H., 1967. Studies of gluten lipids. Distribution of lipids in gluten fractions separated by solubility in 70 p. 100 ethanol. *Cereal Chem.*, **44**, 427-435.

REDMAN D. G., EWART J. A., 1971. Measurements on disulphide bonds in cereals glutenins. *J. Sci. Food Agric.*, **22**, 19-21.

ROSWELL E. V., GOAD L. J., 1962. Latent beta-amylase of wheat : its mode of attachement to glutenin and its release. *Biochem. J.*, **84**, 73 P-74 P.

SECKINGER H. L., WOLF M. J., 1970. Electron microscopy of endosperm protein from hard and soft wheats. *Cereal Chem.*, **47** (3), 236-243.

SIMMONDS D. H., 1972. The ultrastructure of the mature wheat endosperm. *Cereal Chem.*, **49**, 212-222.

SIMMONDS D. H., 1972. Wheat grain morphology and its relationship to dough structure. *Cereal Chem.*, **49**, 324-335.

SPACKMAN D. H., STEIN W. H., MOORE S., 1960. The disulfide bonds of ribonuclease. *J. Biol. Chem.*, **235**, 648-659.

STEVENS D. J., 1966. The reaction of wheat proteins with sodium sulphite. *J. Sci. Food Agric.*, **17**, 202-204.

SULLIVAN B., DAHLE L. K., SCHIPKE J. H., 1963. The oxydation of wheat flour. *Cereal Chem.*, **40**, 515-531.

TANAKA K., BUSHUK W., 1973 *a*. Changes in flour proteins during dough-mixing. I. Solubility results. *Cereal Chem.*, **50**, 590-596.

TANAKA K., BUSHUK W., 1973 *b*. Changes in flour proteins during dough-mixing. II. Gel filtration and electrophoresis results. *Cereal Chem.*, **50**, 597-605.

TANAKA K., BUSHUK W., 1973 *c*. Changes in flour proteins during dough-mixing. III. Analytical results and mechanisms. *Cereal Chem.*, **50**, 605-612.

TAYLOR N. W., CLUSKEY J. E., 1962. Wheat gluten and its glutenin components : viscosity diffusion and sedimentation studies. *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 399-405.

TSCHOEGL N. W., 1961. Chloroethanol as a cereal protein dispersant. *Cereal Chem.*, **38** (6), 516-529.

TSEN C. C., HLINKA I., 1967. Flour improvers : their effects, applications and chemical actions. *Baker's Dig.*, **41** (5), 58-62.

TRACEY M. V., 1967. Gluten : new light on an old protein. *Cereal Sci. Today*, **12** (5), 193-197.

WALL J. S., 1964. Cereal proteins. *Symposium on foods : proteins and their reactions*, **14**, 315-341.

Wall J. S., 1971. A review of the composition properties and distribution of some important wheat flour constituents. *Cereal Sci. Today*, **16** (12), 412-429.

Weil L., Seibles S. T., 1961. Reaction of reduced disulfides bonds in alpha-lactalbumin and beta-lactaglobulin with acrylonitrile. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 470-473.

Wellings S. R., Deome K. B., 1961. Milk protein droplet formation in the Golgi apparatus of the C_3H/Crgl mouse mammary epithelial cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 479-486.

Woychik J. H., Huebner F. R., Dimler R. J., 1964. Reduction and starch gel electrophoresis of wheat gliadin and glutenin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **105**, 151-155.

Wu V. Y., Cluskey E. J., 1965. Optical rotary dispersion studies on wheat gluten proteins : gluten, glutenin and gliadin in urea and hydrochloric acid solutions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 32-36.

Wu V. Y., Dimler R. J., 1963. Hydrogen ion equilibria of wheat glutenin and gliadin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**, 310-315.

Yon J., 1969. *Structure et dynamique conformationnelle des protéines*. 163-164. Éd. Hermann, Paris.

Zahler W. L., Cleland W. W., 1968. A specific and sensitive assay for disulfides. *J. Biol. Chem.*, **243** (4), 716-719.

Ann. Technol. agric., 1974, **23** (4).

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE

J. C. Autran. — Les désoxyribonucléoprotéines et les histones du grain de blé. Aspects physico-chimique et physiologique..... 1

Y. Beaux, R. Drapron. — Isolement et quelques caractéristiques physico-chimiques de la lipoxygénase de la fève (*Vicia faba* L.) 222

A. Belloc, J. C. Palla, J. Verrier. — Isolement purification et propriétés de deux amylases d'origine fongique..... 141

A. Belloc, J. C. Palla, J. Verrier. — Isolement, purification et propriété de deux protéases de *Streptomyces*..... 205

M. Berger, P. Grandvoinnet. — Comparaison de l'action des alpha-amylases bactérienne, fongique et de malt d'orge en panification..... 161

M. Berger, P. Grandvoinnet. — Méthode de dosage différentiel d'alpha-amylases bactérienne et fongique en solution..... 215

M. Berger, P. Grandvoinnet, J. F. de la Guérivière, G. Bussière. — Tests de rhéologie pratique utilisables pour l'appréciation des activités protéolytiques 233

P. Brechot, J. Chauvet, M. Croson. — Influence de la concentration initiale de l'acide malique des moûts sur le déclenchement et l'évolution de la fermentation malolactique..... 411

G. Bussière, J.-F. de la Guérinière. — Utilisation d'alpha-amylase et de glucamylase en technologie de panification industrielle..... 175

J. M. Caillat, R. Drapron. — La lipase du blé. Caractéristiques de son action en milieu aqueux et peu hydraté..... 273

M. C. Camus, J. C. Laporte. — Étude de la teneur et de la répartition des inhibiteurs trypsiques de divers blés durs (*T. durum*) et blés tendres (*T. vulgare*) par une méthode sur film de gélatine..... 421

A. Casanova. — L'ionométrie. Dosage du calcium dans les vins..... 403

A. Chargelegue. — Lipoxygénase et pain français. Influence de la lipoxygénage *in situ* et purifiée en panification..... 375

A. Colas, A. Chargelegue. — Activités lipasique et lipoxygénasique des blés et produits de mouture..... 323

A. Colas. — Tests de rhéologie pratique utilisables pour l'appréciation des activités protéolytiques..... 241

Nicole Crozet, Alice de Pastors, L. Petit. — Structure submicroscopique des fractions protéiques du gluten de blé soumises à l'action de différentes enzymes protéolytiques..... 51

R. Delecourt. — Isolement, purification et propriétés d'amylases bactériennes et fongiques 127
R. Delecourt. — Purification et propriétés des protéases bactérienne ou fongique 193
R. Drapron, Y. Beaux, M. Cormier, J. Geffroy, J. Adrian.— Répercussions de l'action de la lipoxygénase en panification. Destruction des acides gras essentiels à l'état libre, des caroténoïdes et des tocophérols, altération du goût du pain 353
P. Ducroo. — Étude de l'action des protéases sur la farine de blé au moyen du farinographe Brabender 249
J. J. Étienne, M. Dubois. — Répercussions de l'action de la lipoxygénase de la fève sur les caractéristiques des pâtes et du pain 333
C. Flanzy, P. André, P. Benard, M. Buret, Y. Chambry, C. Jouret. — Fermentation intra-cellulaire des baies de raisin au cours de leur métabolisme anaérobie 481
J. F. de la Guérivière, G. Bussière. — Utilisation des protéases dans les industries de cuisson des céréales 257
R. Guinet. — Lipoxygénase et pain français. Nature et évolution du goût du pain français 385
A. Latrasse, B. Lantin. — Différences variétales parmi les hydrocarbures monoterpéniques de l'huile essentielle des bourgeons de Cassis 65
R. Monet, Y. Bastard, Bernadette Campoy. — Étude de la variation de la dureté du fruit *in situ* chez le Pêcher 3
G. Montedoro, P. Fantozzi, M. Bertuccioli. — Essais de vinification de raisins blancs avec macération à basse température et macération carbonique 73
Barbara Neumannova, A. Paulin. — Conditions de température et d'humidité relative à appliquer dans les chambres de floraison d'œillets 467
J. Nicolas, Y. Beaux, R. Drapron. — Les méthodes de mesure de l'activité lipoxygénasique. Mise au point d'une nouvelle méthode 281
Andrée Ournac, C. Poux. — La peroxydase du raisin. Étude de quelques propriétés 17
J. C. Palla, J. Verrier. — Inhibition de la lipoxygénase de fève par des dérivés de l'hydroquinone 367
J. C. Palla, J. Verrier. — Inhibition de l'alpha-amylase de blé par l'acide ascorbique et par les dérivés de l'isoalloxazine 153
L. Petit. — Étude critique des méthodes chimiques de dosage des activités protéolytiques 225
J. Philippon, M. A. Rouet-Mayer. — Stade de développement physiologique des haricots verts à la récolte et qualité du produit surgelé fini. I. — Tests objectifs de la qualité des haricots verts frais destinés à la congélation.. 433
S. Rochize. — L'emploi des enzymes dans les pays de la C. E. E. Législation.. 309
M. A. Rouet-Mayer, J. Philippon. — Stade de développement physiologique des haricots verts à la récolte et qualité du produit surgelé fini. II. — Évolution des teneurs en matière sèche, en acide ascorbique et en

chlorophylles *a* et *b* dans le péricarpe et les graines de haricots verts en cours de végétation 451

Mises au point :

J. Guegen, J. Lefebvre, L. Petit. — Les gluténines 501

J. P. Touzel. — La demande biochimique en oxygène. Détermination et valeur de la mesure 97

Chronique des livres 113

Informations 115

CONTENTS

J. C. Autran. — The desoxyribonucleoproteins and histones of wheat seed. Physiochemical and physiological aspects 1

Y. Beaux, R. Drapron. — The isolation and some physico-chemical characteristics of lypoxygenase of the horse bean (*Vicia faba* L.) 309

A. Belloc, J. C. Palla, J. Verrier. — Isolation, purification and properties of two amylases of fungal origin 141

A. Belloc, J. C. Palla, J. Verrier. — Isolation, purification and properties of two proteases from *Streptomyces* 205

M. Berger, P. Grandvoinnet. — Comparison in breadmaking of bacterial alpha-amylase, fungal alpha-amylase activity and of the activity of alpha-amylase extracted from barley cristallized malt (Cristomalt) 161

M. Berger, P. Grandvoinnet. — A method for the differential determination of bacterial and fungal alpha-amylases in solution 215

M. Berger, P. Grandvoinnet, J. F. de la Guérivière, G. Bussière. — Practical rheology tests for the valuation of proteolytic activities 233

P. Brechot, J. Chauvet, M. Croson. — Effect of initial malic acid concentration of musts on starting off and evolution of malolactic fermentation 411

G. Bussière, J. F. de la Guérivière. — The use of alpha-amylase and glucamylase in bakery 222

J. M. Caillat, R. Drapron. — Wheat lipase. Characteristics of its action in aqueous and dry media 273

M. C. Camus, J. C. Laporte. — Study of the content and distribution of the trypsin-inhibitors of different wheats (*T. durum* and *T. vulgare*) with a method on gelatine film 421

A. Casanova. — Ionometry. The determination of the calcium content in wines 403

A. Chargelegue. — Lipoxygenase and french bread. Influence of *in situ* and purified lipoxygenase in panification 375

A. Colas, A. Chargelegue. — Lipasic and lipoxygenasic activity of wheats and products of milling 323

A. Colas. — Practical rheology tests for the valuation of proteolytic activities 241

Nicole Crozet, Alice de Pastors, L. Petit. — Submicroscopic structure of protein fractions from corn gluten during hydrolysis by various proteolytic enzymes 51

R. Delecourt. — Isolation, purification and properties of bacterial and fungal amylases 127

R. Delecourt. — Isolation, purification and properties of bacterial and fungal proteases 193

R. Drapron, Y. Beaux, M. Cormier, J. Geffroy, A. Adrian. — Lipoxygenase action during bread making. Destruction of essential free fatty acids, carotenoids and tocopherols. Deterioration of the flavour of the bread.. 353

P. Ducroo. — Study of proteases action on wheat flour by means of the Bradender farinograph 249

J. J. Etienne, M. Dubois. — Effects of lipoxygenase action of the broad bean on the characteristics of doughs and bread 335

C. Flanzy, P. André, P. Bénard, M. Buret, Y. Chambroy, C. Jouret. — Intracellular fermentation of grapes during anaerobic metabolism 481

J. F. de la Guérivière, G. Bussière. — The use of proteases in the cereal baking industries 257

R. Guinet. — Lipoxygenase and french bread. The nature and the evolution of the flavour of french bread 385

A. Latrasse, B. Lantin. — Varietal differences between the monoterpene hydrocarbons of the essential oil of black currant buds 65

R. Monet, Y. Bastard, Bernadette Campoy. — Study on the firmness variation of the peach fruit *in situ* 39

G. Montedoro, P. Fantozzi, M. Bertuccioli. — Wine-making from white grapes by maceration at low temperature and by carbonic maceration 75

Barbara Neumannova, A. Paulin. — Temperature and relative humidity needed in stores used for opening of carnations 467

J. Nicolas, Y. Beaux, R. Drapron. — Lipoxygenase activity assays. Development of a new colorimetric method 287

Andrée Ournac, C. Poux. — Peroxydase of the grape. Research on some properties 17

J. C. Palla, J. Verrier. — Inhibition of bean lipoxygenase by hydroquinone derivatives 367

J. C. Palla, J. Verrier. — Wheat alpha-amylase inhibition by ascorbic acid isoalloxazine derivatives 151

L. Petit. — Critical study of the chemical methods of titration of proteolytic activities 223

J. Philippon, M. A. Rouet-Mayer. — Physiological stage of development of french beans at harvest time and quality of the deep frozen produce. I. — Objective quality tests of french beans intended for freezing 433

S. Rochize. — Use of enzymes in EEC countries. Legislation 391

M.-A. Rouet-Mayer, J. Philippon. — Physiological stage of development of french beans at harvest time and quality of the deep-frozen produce. II. — Evolution of the amounts of dry matter, ascorbic acid and chlorophylls *a* and *b* in the pericarp and seeds of french beans during growth.. 451

Bibliographical reviews :

J. Gueguen, J. Lefebvre, L. Petit. — Glutenins..... 501

J. P. Touzel. — Biochemical oxygen demand : determination and value..... 97

Book review 113

Informations 115

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *Résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborateurs, les fonds, les dons...; h) *références bibliographiques.*

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (Dupont et Duval, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) : le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

Envoi du manuscrit : Mme Collon, Station d'Oenologie et de Technologie végétale, 11104 Narbonne, ou M. B. L. Dumont, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Viande, 78350 Jouy en Josas. On demande deux exemplaires.

Correction des épreuves : les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à cette même adresse.

Technologie agricole.

Le Directeur de la publication : M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 6-1975

Dépôt légal : 2e trimestre 1975. N° d'impression : 446